NEUES VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON ALKYLHISTIDINEN UND DEREN VERWENDUNG ZUR DARSTELLUNG VON HORMONDERIVATEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hartmut Wollmann

aus Roigheim

1983

NEUES VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON ALKYLHISTIDINEN UND DEREN VERWENDUNG ZUR DARSTELLUNG VON HORMONDERIVATEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hartmut Wollmann

aus Roigheim

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 1983

Dekan:	Professor Dr.Joachim Strähle
1. Berichterstatter:	Professor Dr.Wolfgang Voelter
2. Berichterstatter:	Professor Dr.Ernst Bayer

Abstract

W o l l m a n n , Hartmut

Neues Verfahren zur Synthese von Alkylhistidinen und deren Verwendung zur Darstellung von Hormonderivaten.

Es wird ein neues Verfahren beschrieben, Histidinderivate herzustellen, die am τ-Stickstoffatom des Imidazolrestes Alkylreste tragen. Dazu wird Histidinmethylester mit Phosgen umgesetzt, es bildet sich unter Cyclisierung und CO-Einschiebung das stabile 5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazopyrimidin. Alkylierung an N^{τ} und Freisetzung mit HCl liefert die N^{τ} -Alkylhistidine in optisch reiner Form. Die Darstellung ist für die D- und L-Verbindung gleichermaßen brauchbar.

Nach Methoden der klassischen Peptidsynthese wird ein Verfahren zur Darstellung von Gonadoliberin beschrieben. Ausgehend vom C-Terminus wird das Molekül aus 3 Fragmenten (L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2, Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu, L-Pyr-L-His-L-Trp) durch Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid aufgebaut. Das aminoständige, als Benzylether geschützte Serin liefert bei der Kondensation schlechte Ausbeuten.

Meiner Familie gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von April 1978 bis Dezember 1980 am Lehrstuhl für Organische Chemie I, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen (Direktor Professor Dr.E.Bayer) und von Februar 1981 bis April 1982 am Physiologisch-chemischen Institut, Abteilung für Physikalische Biochemie unter wissenschaftlicher Anleitung von Professor Dr.W.Voelter angefertigt.

Herrn Professor Dr.Wolfgang Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung, sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr.Ernst Bayer
danke ich für die bereitwillige Überlassung von Institutseinrichtungen.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums herzlich gedankt.

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Herrn Bartholomä (MS, FD-MS), Herrn Müller (^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR) und Herrn Dr. Fuchs (^{13}C-NMR) danken. Frau Munari und Herrn Dr. Stock sei für die Durchführung der Aminosäurenanalysen, Fräulein Seifried und Herrn Wurmstich für die Durchführung der Elementaranalysen gedankt.
Fräulein Alice Wilczek danke ich für die eifrige und sorgfältige Durchführung präparativer Arbeiten im Labor.

Besonderen Dank schulde ich Frau Hella Schmid für die Anfertigung des Manuskripts.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0017

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Allgemeiner Teil	
1.	Vorkommen N^{im}-alkylierter Histidine	1
2.	Die Rolle des Histidins und seiner N-alkylierten Derivate in Biomolekülen	3
2.1.	Hämoglobin	3
2.2.	Ribonuclease S	4
2.3.	Angiotensin II	4
2.4.	Thyreoliberin	5
2.5.	Gonadoliberin	6
II.	Themenstellung	7
III.	Spezieller Teil	8
1.	Synthese der N^{τ}-Alkylhistidine	8
1.1.	Totalsynthese	8
1.2.	Direkte Alkylierung	8
1.3.	Alkylierung nach reversiblem Schutz eines Imidazol-Stickstoffs	10
1.3.1.	Intramolekularer Schutz des N^{π}-Stickstoffs	10
1.3.1.1.	Nebenprodukt	14
1.3.1.2.	Überlegungen zum Mechanismus	21
1.3.2.	Alkylierung des N^{τ}-Stickstoffs	23
1.3.3.	Freisetzung der N^{τ}-Alkylhistidine	25
2.	Syntheseweg zur Darstellung Histidin-analoger Gonadoliberin-Derivate	28
2.1.	Die Modellsubstanz: Gonadotropin-"Releasing"-Hormon	28
2.1.1.	Vorüberlegungen zur Synthese	28

2.2.	Synthese des C-terminalen Tripeptidamids H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2	31
2.3.	Synthese des Tetrapeptidmethylesters H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe	37
2.4.	Synthese des Pentapeptidmethylesters Adpoc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe	40
2.5.	Synthese des Heptapeptidamids H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2	44
2.6.	Synthese des Octapeptidamids Adpoc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2	46
2.7.	Synthese des aminoterminalen Tripeptids H-Pyr-His-Trp-OH	48
2.8.	Synthese des geschützten Gonadoliberins H-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2	52
2.9.	Peptidsynthesen unter Verwendung der dargestellten N^{τ}-Alkylhistidine	54
IV.	Experimenteller Teil	56
1.	Allgemeine Methoden	56
1.1.	Chromatographie	56
1.2.	Spektroskopische Methoden	57
1.2.1.	Kernresonanzspektrometrie	57
1.2.2.	Massenspektrometrie	57
1.2.3.	Drehwerte	57
1.2.4.	Sonstige Geräte	58
1.2.5.	Chemikalien	58
2.	Arbeitsvorschriften	61
2.1.	Synthese der N^{τ}-Alkylhistidine	61

2.2. Synthese des Tripeptidamids H-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 67

2.3. Synthese von H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe 73

2.4. Synthese von Adpoc-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe 81

2.5. Synthese von H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 83

2.6. Synthese von Adpoc-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 85

2.7. Synthese des aminoterminalen Tripeptids H-L-Pyr-L-His-L-Trp-OH 87

2.8. Synthese des geschützten Decapeptids H-L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 93

2.9. Peptidsynthese unter Verwendung der N^{τ}-Alkylhistidine 94

V. Zusammenfassung 96

VI. Literaturverzeichnis 98

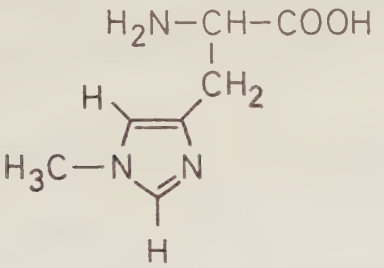
Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Adpoc	=	1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl
Boc	=	tert.-Butyloxycarbonyl
Bzl	=	Benzylether
DCC	=	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	Dimethylformamid
EE	=	Essigsäure ethylester
EtOH	=	Ethanol
Et	=	Ethyl
FD-MS	=	Felddesorptions-Massenspektrometrie
HOBt	=	1-Hydroxybenzotriazol
HAc	=	Essigsäure
Mbs	=	p-Methoxybenzolsulfonyl
Me	=	Methyl
MeOH	=	Methanol
OMe	=	Methylester
OBzl	=	Benzylester
PFT	=	Puls-Fourier-Transformation
OSu	=	N-Hydroxysuccinimidester
THF	=	Tetrahydrofuran
Z	=	Benzyloxycarbonyl

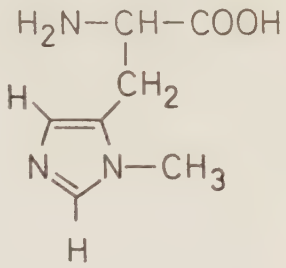
I. ALLGEMEINER TEIL

1. Vorkommen N^{im}-alkylierter Histidine

Der Nachweis der beiden isomeren Aminosäuren 1-Methylhistidin und 3-Methylhistidin, nach IUPAC-Nomenklatur[1] N^{π}-(pros)- und N^{τ}-(tele)-Methylhistidin gelang schon relativ früh:



3-Methylhistidin
N^{τ}-Methylhistidin



1-Methylhistidin
N^{π}-Methylhistidin

N^{π}-Methylhistidin wurde schon 1938 als Bestandteil des Anserins[2] erkannt, einem Dipeptid der Struktur ß-Alanyl-L-N^{π}-methylhistidin, das in Fleischextrakten nachgewiesen wurde[3]. Die freie Aminosäure N^{π}-Methylhistidin[4] wurde - wie auch die N^{τ}-Methyl-Verbindung[5] - erstmals aus Urin isoliert. Aus Walfischfleisch konnte man die zum Anserin isomere Verbindung, das ß-Ala-L-N^{τ}-Methyl-His[6] isolieren. Das entsprechende nicht-methylierte Dipeptid, das Carnosin, kommt in der Muskulatur vieler Spezies vor[7].

Die Tatsache, daß das τ-Methyl-Derivat spezifisch nur im Walfisch in hoher Konzentration vorkommt, nutzte Carisano[8], um mittels Dünnschichtchromatographie N^{τ}-Methylhistidin neben Histidin und N^{π}-Methylhistidin nachzuweisen. Damit

hatte er die Möglichkeit, in Fleischextrakten Walfischanteile nachzuweisen. Auch heute noch wird der Nachweis der beiden methylsubstituierten Histidine in Proteinprodukten als Beweis ihrer fleischlichen Herkunft bzw. zum Nachweis des Fleischanteils benutzt[9], wobei mittels Mitteldruck-Ionenaustauschchromatographie die Trennung und mittels Papierchromatographie die Identifikation der Derivate[10] erfolgt.

Die Aminosäure N^{τ}-Methylhistidin ist Bestandteil der myofibrillären Proteine Actin und Myosin[11], die praktisch das gesamte, im Körper gebildete 3-Methylhistidin beinhalten[12]. Die Methylierung erfolgt erst nach dem Einbau des Histidins in die jeweilige Peptidkette[13].

Das beim Abbau dieser Proteine freigesetzte Aminosäurederivat wird offenbar nicht mehr zur Biosynthese wiederverwendet, sondern quantitativ mit dem Urin ausgeschieden. Damit stellt die Konzentration von N^{τ}-Methylhistidin im Urin ein Maß dar für den Umsatz myofibrillärer Proteine bei Tieren[14] und beim Menschen[15]. Heute bestimmt man diese seltene Aminosäure im Nanogrammbereich mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie[16] nach Anfärbung mit Ninhydrin/o-Phthalaldehyd-Reagenz[17] bzw. durch Fluoreszenz-Detektion[18] ohne aufwendige Aufarbeitung direkt im Urin.

Eine erhöhte Ausscheidung N-methylierter Histidine findet sich z.B. bei der progressiven Muskeldystrophie des Menschen und auch bei ernährungsbedingter muskulärer Dystrophie[19].

2. Die Rolle des Histidins und seiner N-alkylierten Derivate in Biomolekülen

Die Aminosäure Histidin spielt - bedingt durch die besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften des Imidazol-Restes - in vielen Enzymen[20], Peptiden und Proteinen eine zentrale Rolle[21]. Histidin kann dabei sowohl als Donor als auch als Acceptor bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken fungieren, die eng benachbarte saure ("Pyrrol-NH")- und basische ("Pyridin-N")-Gruppierung kann eine Protonenübertragung erleichtern. Der Imidazol-Ring kann als aromatisches System Metallkomplexe bilden[21], er liegt in 2 tautomeren Formen vor, die auch in biologischen Molekülen nachgewiesen werden können.

2.1. Hämoglobin

Zwei der sechs Eisenliganden im Häm-Protein-Komplex werden von N^{τ}-Stickstoffatomen zweier Histidylreste der Globinkomponente gebildet, wobei die Änderung des Säurecharakters des Hämoglobins in Abhängigkeit von der O_2-Beladung Ausdruck einer pK-Wert-Änderung des Imidazolium-Stickstoffs ist[23]. Der Einsatz alkylierter Imidazol- und Histidinderivate bei der Erforschung der reversiblen O_2-Fixierung[107-109] hat zur Aufklärung des Mechanismus beigetragen.

Auch im aktiven Zentrum des Vitamins B_{12} ist ein Imidazolrest am Zustandekommen der für die Funktion notwendigen Strukturen beteiligt[24].

Es ist deshalb nicht überraschend, daß die Substitution durch einen unpolaren Alkylrest an einem der beiden Stick-

stoffatome des Imidazols die biologisch-chemischen Eigenschaften des Moleküls drastisch ändert. Dies sei an einigen Beispielen demonstriert.

2.2. Ribonuclease S

An der synthetischen Ribonuclease S konnte durch Einbau von N^{π}- und N^{τ}-Methyl-L-histidin gezeigt werden[25], daß beide Stickstoffatome für eine optimale katalytische Funktion erforderlich sind. N^{τ} ist als Säure-Base-Katalysator essentiell für die katalytische Reaktion selbst (Bindung und Aktivierung des S-Proteins), N^{π} hält über die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke den Imidazol-Ring in der notwendigen, korrekten Position.

2.3. Angiotensin II

Für das Angiotensin II, ein Octapeptid mit der z.Zt.stärksten bekannten vasopressorischen Wirkung wurde die Rolle der Imidazol-Stickstoffatome genau untersucht: Parallel zum Abbau der Imidazol-Seitenkette mit Hilfe von Photooxidation schwindet die biologische Aktivität der Verbindung[26]. Durch Synthese verschiedener Analoga konnte gezeigt werden, daß die beiden heterocyclischen N-Atome des Histidins bei der Reaktion mit dem Rezeptor verschiedene Funktion haben und nicht austauschbar sind[27]: Das tele-Pyrrol-NH spielt bei der Vermittlung der pressorischen Wirkung die Hauptrolle, während das pros-Pyridin-N weniger wichtig ist. Die relative Lage beider zueinander ist eine der 3 Strukturen im Molekül[28], die für die Erkennung des Rezeptors erforderlich sind.

Man kann daraus schließen, daß nur ein Teil der beiden tautomeren Formen des Histidins von biologischer Signifikanz ist, wie man für Angiotensin (τ-Pyrrol-NH) und Thyreoliberin[29] (π-Pyridin-N) zeigen konnte, unabhängig davon, ob es sich um die in Lösung bevorzugt vorliegende tautomere Form handelt.

Die in Lösung durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie nachgewiesene, bevorzugte tautomere Form[30,31] muß also nicht identisch sein mit der am Rezeptor aktiven Form, sodaß der Rückschluß auf die Struktur des Rezeptors u.U. irreführend ist.

2.4. Thyreoliberin (TRH)

Beim Thyreoliberin (TRH) wurde ebenfalls nachgewiesen, welche zentrale Rolle dem Imidazol-Rest des Histidins bei der Vermittlung der biologischen Aktivität zukommt: Führt man bei dem Tripeptid mit der Sequenz L-Pyr-L-His-L-Pro-NH_2 eine Methylgruppe an N^{π} ein, erhält man eine inaktive Verbindung, während das N^{τ}-methylsubstituierte Derivat die 800-fache Aktivität der nativen Verbindung[32,33] hat. Da TRH in basischer Lösung bevorzugt in der N^{τ}-H-Form vorliegt, wie durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte [22] und die "superaktive" Verbindung auch in τ-Position substituiert ist, kann man schließen, daß die Wechselwirkung mit dem Rezeptor über nicht-gebundene, van der Waals'sche Kräfte über dieses N-Atom erfolgen muß.

Die Bestimmung der pK-Werte in N^{τ} - und N^{π}-methylsubstituierten Thyreoliberin-Derivaten zeigt, daß die π-methy-

lierten Derivate von TRH und Histidin stärker basisch sind als die unmethylierten Verbindungen, während durch Methylierung in der τ-Position die Basizität erniedrigt wird[34].

2.5. Gonadoliberin (LH-RH)

Beim Gonadotropin-freisetzenden Hormon (Gn-RH,LH-RH), das Gegenstand intensiver Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen war und ist [35,36,37], hat man schon früh erkannt, daß die His-Trp-Sequenz ein aktives Zentrum darstellt, während die Sequenz 6-10 für die Rezeptorbindung und Erhaltung der Konformation von Bedeutung sind.

Der Verzicht auf Histidin in diesem Molekül hat nicht nur den Verlust der Aktivität zur Folge, sondern führt zu einer Verbindung mit antagonistischer Gn-RH-Wirkung[38], die noch verstärkt wird, wenn man anstelle von L-His D-Phe in das Molekül einbaut[39]. Substanzen mit antagonistischer LH-RH-Wirkung stehen heute im Mittelpunkt der Forschung, da man hofft, wirksame Mittel zur Geburtenkontrolle zu finden.

Der Ersatz von L-Histidin^2 im LH-RH durch L-Homohistidin (4-(4-Imidazolyl)-L-aminobuttersäure)[40] hat einen völligen Verlust der biologischen Aktivität zur Folge. Die N^{τ}-Methylhistidin^2-Verbindung hat eine Aktivität von 1-6 % der nativen Verbindung[41].

Nair[42] dagegen beschreibt ein "superaktives" Analogon von LH-RH, das - außer einer D-Leu^6 und der Prolinethylamid^9-Funktion - ein nicht näher spezifiziertes His(N-Methyl)^2 enthält.

II. THEMENSTELLUNG

Die Bedeutung der Aminosäure Histidin mit ihren einzigartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften für eine große Zahl von biologischen Molekülen ist bekannt und anhand zahlreicher Beispiele belegt. Durch Synthese Histidin-analoger Verbindungen konnten in vielen Fällen Rückschlüsse auf den Mechanismus biologisch-chemischer Reaktionen und die Struktur der beteiligten Reaktionspartner gezogen werden. Dennoch scheiterte z.B. der breite Einsatz N^{im}-alkylierter Histidine immer wieder an der schlechten Verfügbarkeit und dem hohen Preis der teilweise aus biologischen Materialien isolierten Verbindungen.

Es soll daher im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, einen praktikablen Syntheseweg zur Darstellung optisch reiner, N^{im}-alkylierter Histidine zu finden.

Darüberhinaus soll eine Möglichkeit erarbeitet werden, N^{im}-alkylierte Histidinanaloga des Gonadoliberins (Gn-RH, LH-RH) zugänglich zu machen. Dabei soll nach Methoden der klassischen Peptidsynthese gearbeitet und aufwendige Reinigungsschritte im Verlauf der Synthese nach Möglichkeit vermieden werden. Die Synthese soll hinsichtlich Ausbeute, Synthesedauer und Schutzgruppeneinsatz optimiert werden.

Die Zwischenverbindungen werden durch ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Massenspektren sowie die üblichen physikalischen Parameter charakterisiert.

III. SPEZIELLER TEIL

1. Synthese der N^{τ}-Alkylhistidine

Will man selektiv nur die N^{π} - oder N^{τ}-Position am Imidazol-Rest des Histidins schützen, so gibt es verschiedene Möglichkeiten:

1.1. Totalsynthese

Man kann im Verlauf einer Totalsynthese des Moleküls den entsprechend substituierten Stickstoff einführen. Dies wurde für die N^{τ}-Methylhistidine wiederholt versucht[43,44,45], scheiterte jedoch am nicht-stereospezifischen Verlauf der Reaktionen bzw. am Fehlen einer brauchbaren Trennmethode für die anfallenden racemischen Gemische.

1.2. Direkte Alkylierung

Man hat versucht, durch direkte Alkylierung des Histidins und geeigneter Derivate die beiden isomeren Alkyl-Verbindungen zu erhalten. Mit den üblichen Alkylierungsverfahren wurden in niedrigen Ausbeuten Gemische der beiden Isomeren erhalten, die schwer trennbar sind[43].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch Phasen-transfer-katalysierte Alkylierung selektiv eines der beiden Imidazol-Stickstoffatome zur Reaktion zu bringen. Diese moderne Methode erschien uns aussichtsreich, zumal eine große Zahl spezifischer Alkylierungen verschiedener organischer Moleküle beschrieben ist[46,47,48].

Zunächst wurde versucht, die Ionenpaar-Extraktionsmethode von Brandström[49], die schon zur direkten N-Alkylierung organischer Moleküle eingesetzt wurde[50], für unser Problem

nutzbar zu machen. Unter Verwendung von Tetrabutylammoniumhydroxid als Katalysator wurden Boc-L-Histidin, Boc-L-Histidinmethylester, Z-L-Histidin, N_{α} -N_{im}-Bis-Z-Histidin und Histidin selbst umgesetzt. Dabei war bei sehr geringen Umsätzen kein spezifischer Reaktionsverlauf nachweisbar.

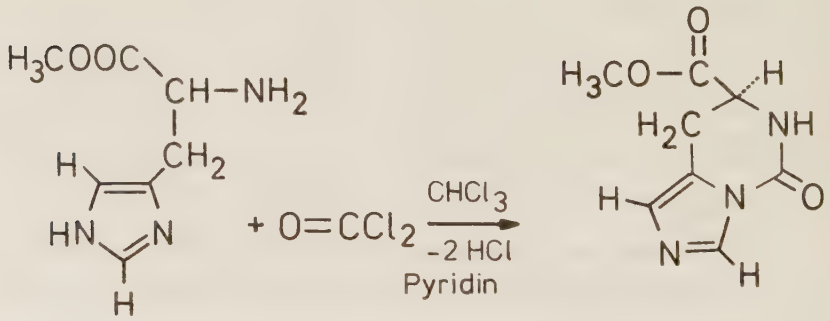
Die Verwendung von Benzyltriethylammoniumchlorid (BTAC) als Katalysator, der bei der selektiven N-Alkylierung von Indol erfolgreich eingesetzt wurde[51)], scheiterte daran, daß alle eingesetzten Histidin-Derivate nach kurzer Zeit von der organischen in die wässrig-alkalische Phase übergingen. Auch der Einsatz von festem, fein pulverisiertem $NaOH/K_2CO_3$ anstelle der wäßrig-alkalischen Phase, der sich schon bei Phasen-transfer-katalysierten N-Alkylierungen bewährt hat[52)], ergab keinen eindeutigen Umsatz. Es wurde dabei sowohl ohne Katalysator als auch mit Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) als Katalysator gearbeitet. Als Lösungsmittel fanden Benzol, Methylenchlorid und Chloroform Verwendung.

Der Einsatz eines Kronenethers (18-Krone-6) als Katalysator der Phasen-Transfer-Alkylierung scheiterte - wie bereits für BTAC oben genannt - daran, daß bei Verwendung einer hochkonzentrierten wäßrig-alkalischen Phase die eingesetzten Histidin-Derivate sich nach kurzer Zeit in dieser Phase wiederfanden und damit zur Reaktion nicht mehr zur Verfügung standen.

1.3. Alkylierung nach reversiblem Schutz eines Imidazol-Stickstoffs

1.3.1. Intramolekularer Schutz des N^{π}-Stickstoffs

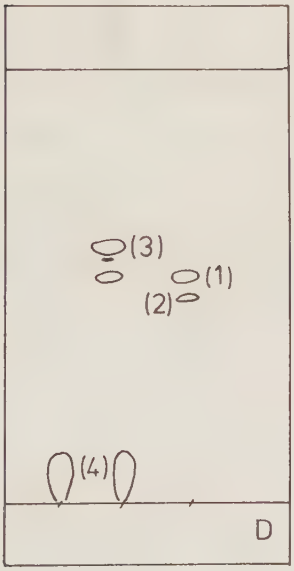
Ein sehr stabiler, voll reversibler Schutz der N^{π}-Funktion des Imidazolrestes am Histidin ist möglich, indem man Histidinmethylester in Gegenwart von Pyridin als Base bei tiefer Temperatur mit Phosgen umsetzt. Die Abbildung zeigt den Reaktionsverlauf:



Darstellung von (7 S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazo(1.5-c)-pyrimidin

Die gezeigte Verbindung fällt in hoher Ausbeute an, wenn man unter -40°C mit Chloroform als Lösungsmittel arbeitet. Der eingesetzte Histidinmethylester muß in freier Form vorliegen, zum Abfangen der bei der Reaktion entstehenden Salzsäure hat sich ein zweifacher Überschuß an frisch destilliertem Pyridin bewährt. Bei Verwendung von Triethylamin als Base werden schlechtere Ausbeuten erzielt. Arbeitet man bei höherer Temperatur oder sind die eingesetzten Verbindungen nicht sauber, so tritt rasch eine Verfärbung des Ansatzes ein, die Ausbeute wird schlechter und eine Kristallisation des Produkts ist praktisch nicht mehr möglich.

Die beste Ausbeute (74 %) wird erreicht, wenn man die Umsetzung nach 30-40 Minuten durch Eingießen in ein kaltes Gemisch von Ether/Hexan stoppt und damit die Verbindung ausfällt.Bei längerer Reaktionszeit steigt die Anzahl und Menge der auch bei kurzer Reaktionszeit schon nachweisbaren Nebenprodukte. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigt, daß kurze Zeit nach Reaktionsbeginn ein Zwischenprodukt geringerer Polarität entsteht, das im Verlauf der Aufarbeitung wieder verschwindet und das trotz zahlreicher Versuche nicht in Substanz faßbar war (vgl. dazu II.1.3.1.2.).



(1) 5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxy-carbonyl-5-oxoimidazo-pyrimidin

(2) N-Ethoxycarbonyl-L-histidin (vgl. III.1.3.1.1.)

(3) Zwischenprodukt (vgl. III.1.3.1.2.)

(4) L-Histidinmethylester

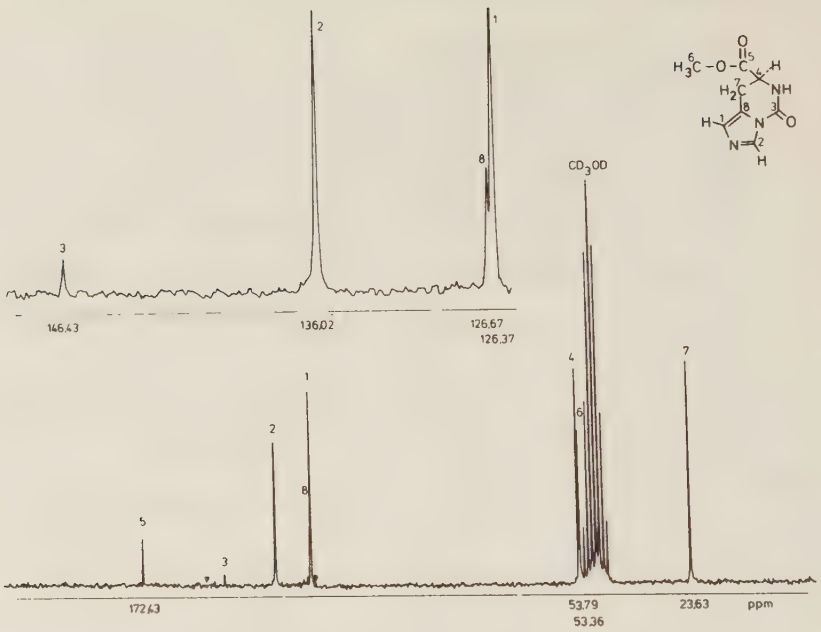


Abb.1: ^{13}C-NMR-Spektrum von (7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazo(1.5-c)pyrimidin, 200 mg in 1.5 ml CD_3OD, 20.115 MHz, 22149 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

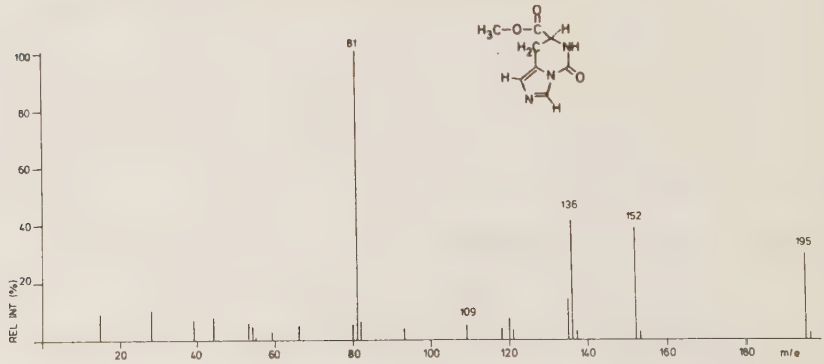


Abb.2: Massenspektrum von 5.6.7.8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazo-pyrimidin, EI = 70 eV, 200°C, Direkteinlaß

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmentionen (abgespaltenes Neutralteil)
195	M^+
152	$M^+ - CONH^+$
136	$M^+ - COOCH_3$
120	$152 - CH_3OH$
93	$152 - COOCH_3$
81	$C_4H_5N_2^+$

Die Verbindung läßt sich aus Methanol in schönen Kristallen und hoher Reinheit kristallisieren. Sie ist bei Raumtemperatur und Lichteinfluß stabil, im Verlauf von 2 Jahren wird keine Zersetzung beobachtet. Die nach unserer Methode neu dargestellte Verbindung ist nach allen verfügbaren Kriterien identisch mit der von Beyerman[53] dargestellten Substanz. Der stereospezifische Verlauf der Umsetzung, der ein (bezogen auf C_α) reines S-Produkt liefert, wird ebenfalls durch Vergleich mit nach [53] hergestelltem Produkt sichergestellt.

Damit steht eine neue Methode zur Verfügung, das oben charakterisierte L-Histidinderivat billig und von einfachen Grundsubstanzen ausgehend, herzustellen. Die Methode kann mit gleichem Erfolg auf D-Histidin übertragen werden.

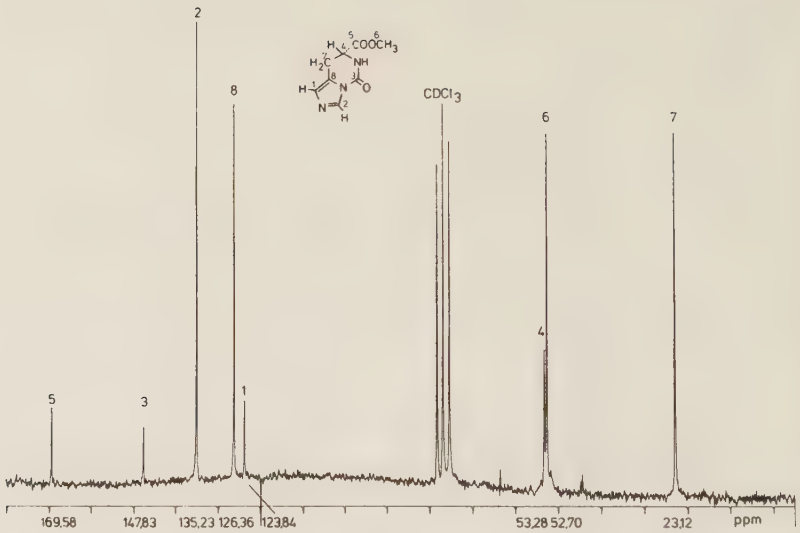


Abb.3: ^{13}C-NMR-Spektrum von (7R)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazo(1.5-c)-pyrimidin; 200 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 22.63 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

1.3.1.1. Nebenprodukt

Bei den zahlreichen Versuchen zur Optimierung der Reaktion tritt in 2 Fällen ein Nebenprodukt auf: Jeweils nach Zugabe des Ethers zur Beendigung der Reaktion und Ausfällung des Produktes erscheint auf dem Dünnschichtchromatogramm neben dem Hauptprodukt eine Substanz mit etwas geringerem Rf von 0.43 (vgl. DC in Abschnitt 1.3.1.).

Die zunächst unbekannte Substanz löst sich wenig in Essigester, mäßig in Ethanol. Sie wird schließlich durch Auf-

kochen des aus der Chloroformphase anfallenden Produktgemisches mit Essigester und Aufnehmen des nicht löslichen Teils in heißem Ethanol in geringer Menge kristallin erhalten. Die Substanz ist dünnschichtchromatographisch einheitlich in 2 Fließmittelsystemen, ist mit Ninhydrin und o-Tolidin anfärbbar und zeigt auf der Platte Fluoreszenz bei 254 nm. Sie hat einen definierten Schmelzpunkt von 113°C und enthält laut Elementaranalyse 49.76 % Kohlenstoff, 6.34 % Wasserstoff und 17.33 % Stickstoff.

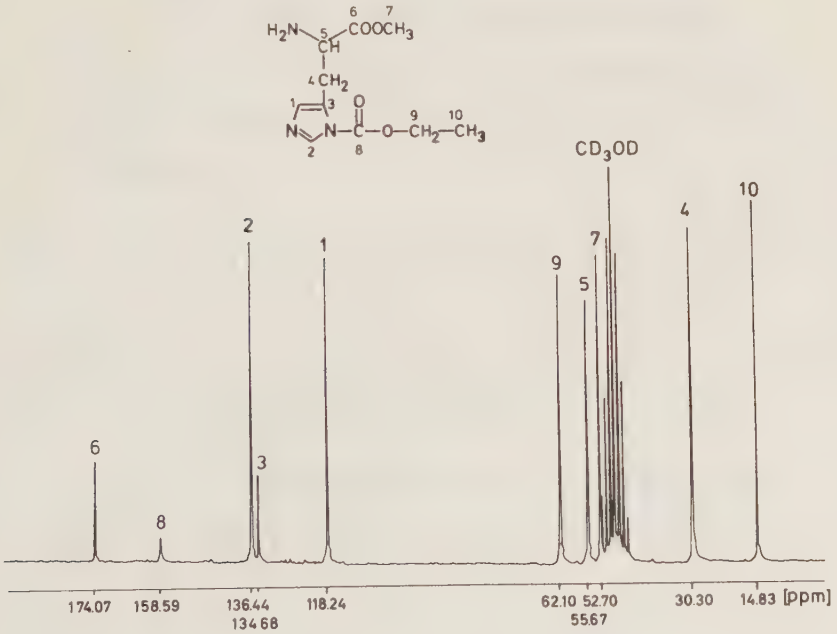


Abb.4: ^{13}C-NMR-Spektrum; 80 mg in CD_3OD; 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 61000 Pulsinterferogramme

Laut Spektrum enthält die Substanz 10 C-Atome. Da die Ausgangsverbindung bekannt ist (L-Histidinmethylester) fällt es leicht, die zum Histidin gehörenden Signale zuzuordnen[54,55,56], zu diskutieren sind drei weitere Signale:

- 14.83 ppm, entsprechend z.B. einer endständigen aliphatischen Methylfunktion
- 62.10 ppm; hier kommen zahlreiche Zuordnungen in Frage
- 158.59 ppm; für den Peptidchemiker typischerweise der Resonanzbereich von Urethan-Kohlenstoffatomen.

Die Hypothese, daß die unbekannte Verbindung zusätzlich zum Histidinmethylester eine $-COOCH_2CH_3$-Gruppierung enthält, bestätigt sich anhand der Elementaranalyse:

$C_{10}H_{15}N_3O_4$ (241.247)

Berechnet: C 49.78 % H 6.26 % N 17.41 %

Gefunden: C 49.76 % H 6.34 % N 17.33 %

Das Protonen-Kernresonanzspektrum, das in Abbildung 5 zu sehen ist, bestätigt die Hypothese:

Wie bereits im ^{13}C-NMR-Spektrum finden sich auch im ^{1}H-NMR-Spektrum die für Histidin erwarteten Signale (1-6, vgl. Tabelle), die beiden Signale für die Ethylurethanfunktion erscheinen bei 1.17 bzw. 4.02 ppm (7+8).

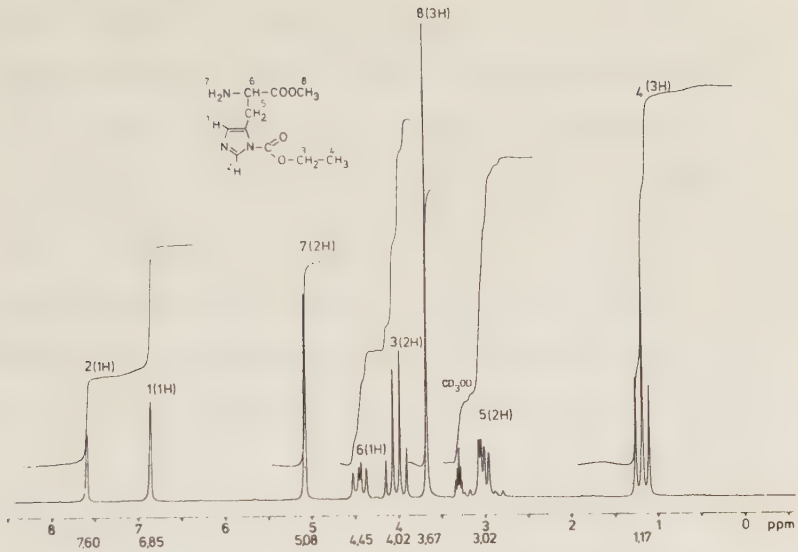


Abb.5: ^{1}H-NMR-Spektrum; 90 MHz, 80 mg in CD_3OD

Tabelle

	ppm	Resonanz
(1)	6.85	C-C<u>H</u>-N, s, (1)
(2)	7.59	N-C<u>H</u>-N,d,J=1,1 Hz (1H)
(3)	5.08	-CH-N<u>H</u>$_2$,s,(2H)
(4)	4.44	α-C<u>H</u>,q, J=5.7 Hz (1H)
(5)	3.67	-O-C<u>H</u>$_3$,s,(3H)
(6)	3.02	ß-C<u>H</u>$_2$,q (2H)
(7)	1.17	-CH$_2$-C<u>H</u>$_3$,t,J=6.1 Hz (3H)
(8)	4.02	-O-C<u>H</u>$_2$-CH$_3$,q,J=7.0 Hz (2H)

Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigt also die Existenz der Ethylurethan-Funktion.

Im Histidin stehen zur Ausbildung einer Urethan-Funktion 3 Stickstoffatome zur Verfügung: N_α sowie N^π und N^τ am Imidazol-Rest. Gegen eine Urethan-Gruppierung am α-Stickstoff des Histidins spricht das Protonen-NMR-Spektrum: In diesem Fall müßten bei Verwendung von CD_3OD als Lösungsmittel zwei NH-Signale im Spektrum zu sehen sein, eines für das verbleibende Proton an N_α, das zweite für das N_{im}-Proton, wobei insbesondere das Signal für das Imidazol-Proton mit einer chemischen Verschiebung von >10 ppm auffallen müßte. Tatsächlich findet man nur 1 Signal bei 5.08 ppm, dessen Integration zudem 2 Protonen entspricht.

Die Urethan-Funktion muß sich demnach an einem der beiden Imidazol-Stickstoffatome gebildet haben.

Diese Folgerung findet ihre Bestätigung in den experimentellen Bedingungen: In Gegenwart der schwachen Base Pyridin wird der Imidazol-Stickstoff (pK = 5.97) bevorzugt deprotoniert und für einen elektrophilen Angriff zugänglich als das α-Aminostickstoffatom (pK = 8.97).

An welchem der beiden Imidazolstickstoffe sich das Ethylurethan gebildet hat, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Zwar ist eine Methode beschrieben, mit Hilfe der Protonen-Kopplungskonstanten z.B. zwischen 1.4- und 1.5-substituierten Imidazolderivaten zu unterscheiden[58], jedoch nur durch Vergleich der Daten der beiden isomeren Derivate, die nicht zur Verfügung stehen.

Überlegungen zur Elektronenstruktur des Imidazolrestes machen wahrscheinlich, daß das Nebenprodukt durch Reaktion mit dem N^{π}-Atom entstanden ist: Betrachtet man Imidazol als heteroaromatisches System, so kommt das erforderliche Elektronensextett folgendermaßen zustande [21]: Der "Pyrrol-Stickstoff" in τ-Position stellt 2 Elektronen im nicht-hybridisierten p-Orbital, während das N-Atom in π-Position nur 1 Elektron im p-Orbital zur Verfügung stellt. Damit bleiben dem π-Stickstoff 2 freie Elektronen, die für einen elektrophilen Angriff zur Verfügung stehen. Es besteht zwar ein tautomeres Gleichgewicht zwischen den beiden Formen, jedoch liegt es in basischer Lösung (wie in unserem Fall) weit auf der Seite des "N^{τ}-Pyrrol-NH" (1-H-Form) [59].

Für eine Reaktion an N^{τ} würde die (nicht näher ausgeführte) Beobachtung von Juliano[34] sprechen, daß aus sterischen Gründen dieser Weg begünstigt sei: Während der τ-Stickstoff des Histidyl-Restes im TRH dem Lösungsmittel frei ausgesetzt ist, ist der π-Stickstoff gehindert und schwer zugänglich.

Da der größte Teil der Ausgangssubstanz über den N^{π}-Stickstoff zum entsprechenden Tetrahydropyrimidin-Derivat (vgl. III. 1.3.1.) reagiert, kann vermutet werden, daß auch die Urethan-Bildung an diesem Atom erfolgt (vgl. auch III.1.3.3.).

Die aus der Summenformel berechnete Masse von 241 für das beobachtete Nebenprodukt N-Ethoxycarbonyl-L-histidinmethylester wird durch das Massenspektrum bestätigt.

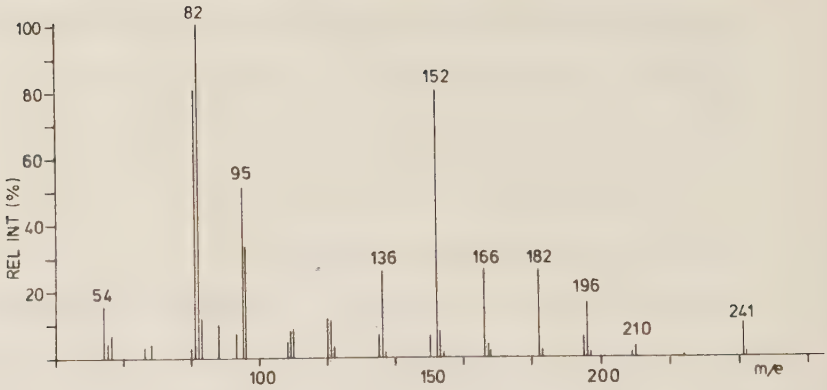


Abb.6: Massenspektrum von N^{im}-Ethoxycarbonyl-L-histidinmethylester. EI = 70 eV, 200°C, Direkteinlaß

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

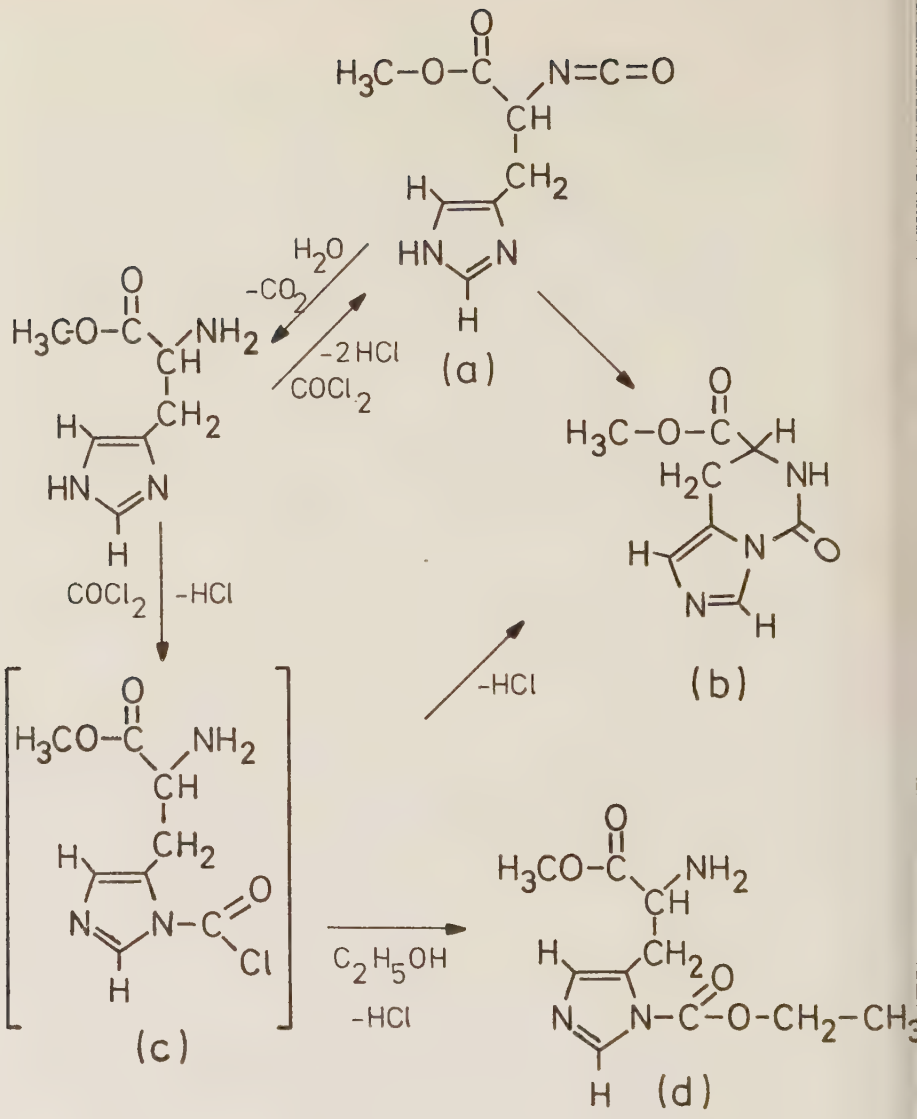
m/e	Fragmention (abgespaltenes Neutralteil)
241	Molekülion M^+
210	$M^+ - 31$ (CH_3O)
196	$M^+ - 45$ (C_2H_5O)
182	$M^+ - 59$ ($COOCH_3$)
152	$C_3N_2H_2-CH_2-CH^+-COOCH_3$
82	$C_4H_6N_2^+$ (Imidazol)

1.3.1.2. Überlegungen zum Mechanismus

Laut Dünnschichtchromatogramm (vgl. 1.3.1.) entstehen bei der Umsetzung vom Histidinmethylester mit Phosgen 2 Zwischenprodukte (davon eines nur in Spuren), die nicht isolierbar und nach der Aufarbeitung nicht mehr nachweisbar sind. Folgende Erklärungen sind denkbar (vgl. S. 22):

a) Aus dem Aminosäuremethylester bildet sich in üblicher Weise [60] unter Abspaltung von 2 Molekülen HCl ein Isocyansäureester (a). Der gebildete Ester reagiert entweder - wie in der Abbildung gezeigt - mit dem N^{π}-Atom des Imidazol-Restes unter Ausbildung des stabilen Tetrahydropyrimidin-Derivates (vgl. III.1.3.)(b) oder beim Waschen mit Wasser unter Abspaltung von CO_2 wieder zum Aminosäureester. Dies erklärt das Verschwinden des Nebenproduktes im Verlauf der Aufarbeitung und das Aufschäumen des Ansatzes beim Aufnehmen in Bicarbonatlösung (vgl. Arbeitsvorschrift).

b) Phosgen reagiert mit dem Imidazol-Stickstoff unter Ausbildung des instabilen "Säurechlorids" (c). Dies kann unter Bildung des Hauptproduktes (b) mit der α-Aminofunktion abreagieren. Das nachgewiesene Nebenprodukt (d) entsteht bei der Unterbrechung der Reaktion durch Zugabe von Ether: Der Ether war (wie sich später herausstellte) deutlich mit Ethanol verunreinigt, wodurch das postulierte Zwischenprodukt (c) in Form des Urethans abgefangen wurde.



c) Die Entstehung des Nebenprodukts (d) wäre auch durch die Bildung von Chlorameisensäureethylester während der Umsetzung aus Phosgen und Ethanol erklärbar. Der Chlorameisensäureester kann mit aktiven Protonen unter Einführung des Ethoxycarbonylrestes reagieren. Da zur Reaktion nur hochgereinigte Sub-

stanzen und Lösungsmittel eingesetzt wurden, ist dieser Weg unwahrscheinlich.

1.3.2. Alkylierung des N^{τ}-Stickstoffs

Alkylierung am N^{τ}-Atom des Imidazolrestes von 5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxoimidazo-(1.5-c)-pyrimidin gelingt leicht und in hohen Ausbeuten, wenn man die Substanz mit 10-fachem Überschuß frisch destilliertem Methyliodid bzw. Ethyliodid in DMF unter Rückfluß erhitzt. Durch einen noch größeren Überschuß an Alkylierungsreagenz - wie in Zitat [53] angegeben - kann die Ausbeute nicht verbessert werden. Die entstehenden Alkyl-pyrimidinium-iodide kristallisieren nach Zugabe von Ether. Es empfiehlt sich, die in reinem Zustand fast weißen Verbindungen unter Lichtausschluß in der Kälte aufzubewahren, da sie sich sonst unter Gelb- und Braunfärbung rasch zersetzen. Abb.7 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum des Methylderivates. Das Signal für die neu eingeführte Methylgruppe findet sich bei 37.71 ppm. Das Spektrum der Ethyl-Verbindung (Abb.8) ist praktisch identisch, das Signal für die Methylengruppe findet sich bei 48.64 ppm, die terminale Methylgruppe erscheint bei 16.66 ppm.

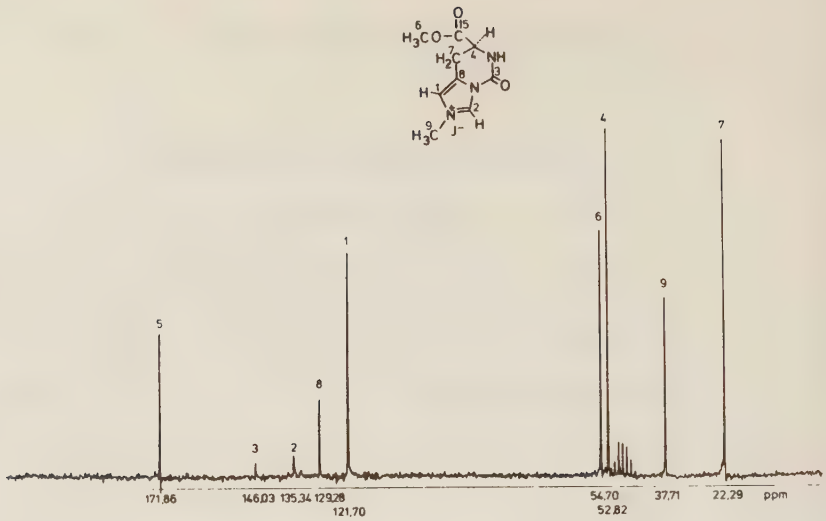


Abb.7: ^{13}C-NMR-Spektrum von (7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-2-methyl-5-oxoimidazo-pyrimidiniumiodid; 200 mg in D_2O; 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 17500 Pulsinterferogramme.

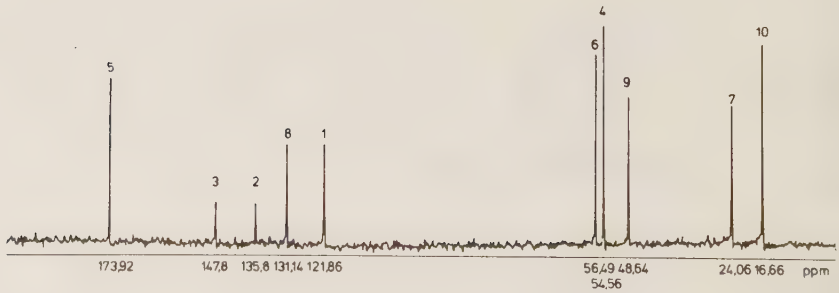


Abb.8: ^{13}C-NMR-Spektrum von (7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-2-ethyl-oxoimidazo-pyrimidiniumiodid; 180 mg in D_2O; 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 11762 Pulsinterferogramme

Im Protonen-NMR-Spektrum erscheint das Signal für die N-Methyl-Protonen als Singulett bei 3.94 ppm. Die Integration zeigt 3 Protonen an.

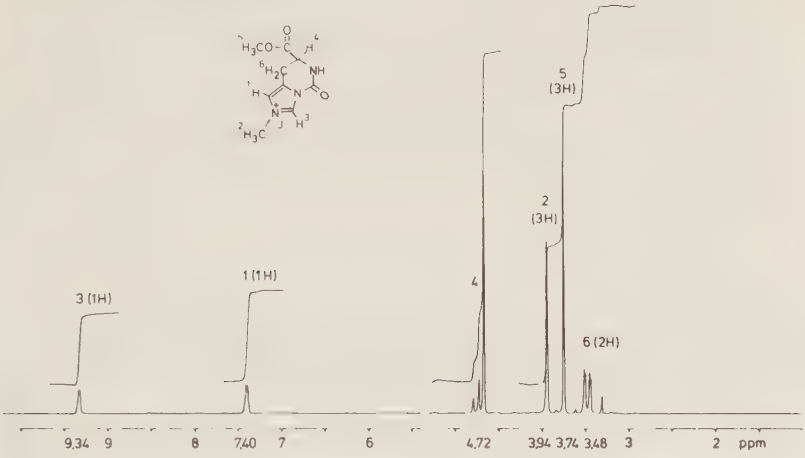


Abb.9: ^{1}H-NMR-Spektrum von (7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-2-methyl-5-oxoimidazo-pyrimidiniumiodid; 200 mg in D_2O; 90 MHz

1.3.3. Freisetzung der N^{τ} -Alkylhistidine

Die Freisetzung der in N^{τ} -Position alkylierten Histidine gelingt leicht und in fast quantitativer Ausbeute durch Kochen mit 6 N HCl[53]. Die N^{τ} -Alkylhistidine kristallisieren als Dihydrochlorid aus Ethanol nach Zugabe von Ether. Es sind bei Raumtemperatur stabile und - im Gegensatz zur Vorstufe - nicht lichtempfindliche Verbindungen. Setzt man sie dagegen frei und hält sie in Lösung bei Raumtemperatur, so tritt eine Zersetzung unter Braunfär-

bung der Lösung ein, wie man sie auch bei freiem Histidinmethylester beobachten kann[26].

Abbildung 10 zeigt das Protonen-Kernresonanzspektrum des dargestellten N^{τ}-Ethylhistidindihydrochlorids in D_2O. Das Signal für die Methylgruppe erscheint als Triplett bei 2.43 ppm (Integration 3 Protonen), das Signal für die Methylengruppe bei 5.21 ppm als Quartett (2 Protonen)[57].

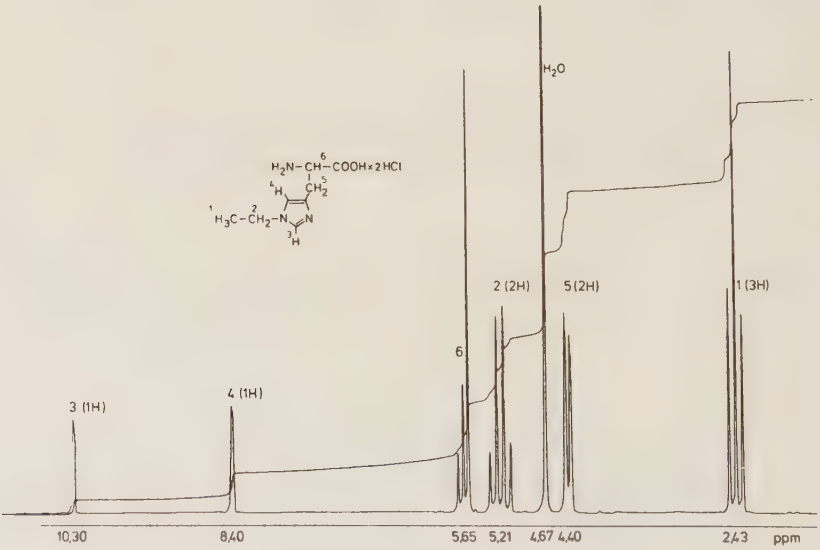


Abb. 10: ^{1}H-NMR-Spektrum von L-N^{τ}-Ethylhistidindihydrochlorid; 2 mg in D_2O; 90 MHz

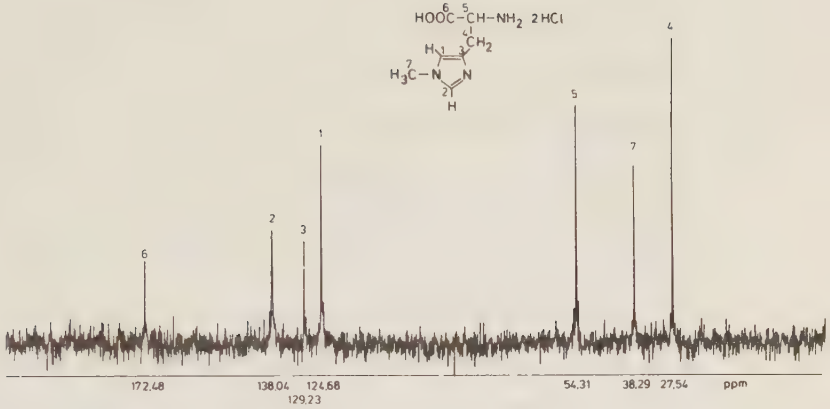


Abb.10a: ^{13}C-NMR-Spektrum von L-N$^{\tau}$-Methylhistidin-dihydrochlorid, 200 mg in 1.5 ml D_2O, 22.63 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

2. Syntheseweg zur Darstellung Histidin-analoger Gonadoliberin-Derivate

2.1. Die Modellsubstanz: Gonadotropin-"Releasing"-Hormon

Als Modellsubstanz für eine Peptidsynthese unter Verwendung der in III.1. dargestellten Alkylhistidine wurde Gonadotropin-"Releasing"-Hormon (Gn-RH,LH/FSH-RH) gewählt. Seit seiner Isolierung [61,62] und Strukturaufklärung [63,64,65] ist dieses Dekapeptid, das im Hypothalamus gebildet wird und in der Hypophyse die Ausschüttung der gonadotropen Hormone bewirkt, Gegenstand intensiver chemischer und medizinischer Forschung.

Anhand zahlreicher synthetischer Analogverbindungen wurde an diesem Molekül systematisch die Beziehung zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität untersucht, wobei einerseits versucht wird, Verbindungen mit verstärkter, verlängerter oder modifizierter agonistischer Wirkung zu erhalten [42], andererseits solche mit antagonistischer Wirkung [66]. Da gerade am Histidylrest alkylierte Verbindungen zu den "superaktiven" Analogen zählen [42], ist es von Interesse, einen einfachen und billigen Zugang zu diesen Verbindungen zu finden.

2.1.1. Vorüberlegungen zur Synthese

Das native Gonadotropin-"Releasing"-Hormon hat folgende Aminosäuresequenz:

L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser-L-Tyr-Gly-L-Leu-L-Arg-L-Pro-Gly-NH_2.

Von den 9 im Molekül vorkommenden Aminosäuren haben 5 eine dritte funktionelle Gruppe in der Seitenkette - wenn man von der "in sich" als Pyroglutaminsäure vorliegenden, geschützten Glutaminsäure absieht. Diese Drittfunktionen können Anlaß zu einer Fülle von Nebenreaktionen im Verlauf der Peptidsynthese geben: So wird bei der Synthese von serinhaltigen Peptiden eine O-Acylierung der alkoholischen Seitenkette beobachtet, wenn - wie in unserem Fall - gleichzeitig Histidin im Molekül vorkommt[67]. Die Indol-Seitenkette des Tryptophans kann bei saurer Demaskierung der Aminofunktion einer Alkylierung unterliegen[68]. Auch die übrigen Aminosäuren können unter Bedingungen der Peptidsynthese Anlaß zu Nebenreaktionen geben[69].

Es wird deshalb für die Synthese ein möglichst vollständiger und stabiler Schutz der Seitenfunktionen angestrebt.

a) Die Guanidino-Funktion des Arginins sollte ursprünglich durch Protonierung mit HBr blockiert werden[70]. Der Einsatz dieses Schutzes, der den Vorteil des Wegfalls nachträglicher Schutzgruppenentfernung hat, scheiterte an folgendem:
   - Die Darstellung und Reinigung der N_G-geschützten Argininhydrobromide erwies sich als unerwartet schwierig und aufwendig.
   - Bei den Kupplungsreaktionen bildeten sich trotz verschiedener Reaktionsbedingungen so viel Nebenprodukte, daß die Reingewinnung des Produktes schwie-

rig war (auch aufgrund seiner ungewöhnlichen Lösungseigenschaften) und nur schlechte Ausbeuten erzielt werden konnten.

Stattdessen wird die von Fujino [71] vorgeschlagene p-Methoxybenzolsulfonylgruppe eingesetzt, die bei hoher Stabilität mit Trifluoressigsäure, Methansulfonsäure oder Flußsäure unter milderen Bedingungen abspaltbar ist als die Tosylgruppe.

b) Die Seitenketten von Serin und Tyrosin werden als Benzylether geschützt. Dieser Schutz bietet ein hohes Maß an Sicherheit, wenn die N-Demaskierung nicht unter zu stark sauren Bedingungen durchgeführt wird[72].

Probleme bei der Abspaltung der Benzylether-Gruppierungen können nicht bestätigt werden: Die hydrogenolytische Abspaltung an einem Modellpeptid mit benachbartem Serin und Tyrosin (Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe) verlief reibungslos und vollständig.

Zum Schutz der α-Aminofunktionen sollen in dieser Arbeit die bewährten Schutzgruppen tert-Butyloxycarbonyl-(Boc) und Benzyloxycarbonyl-(Z) verwendet werden. Im Falle des Tryptophans wird - um die oben erwähnte tert-Butylierung bei Demaskierung zu vermeiden - die unter besonders mild sauren Bedingungen abspaltbare, neue 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-Schutzgruppe[73] eingesetzt.

Die optische Reinheit der dargestellten Verbindungen ist - auch im Hinblick auf mögliche biologische Aktivität - von großer Bedeutung. Insbesondere bei der Synthese histidinhaltiger Peptide wird eine Racemisierung häufig beobachtet[74]. Ansätze zur Verhinderung der Racemisierung werden vorgeschlagen[75] und ein möglicher Mechanismus durch intramolekulare Basenkatalyse des N^{π}-Stickstoffs wird diskutiert[76]. Es werden daher nur Kupplungsmethoden eingesetzt, die nach bisherigem Wissen ohne Racemisierung verlaufen, wie die DCC/HOBt-Methode[77,78] und die N-Hydroxysuccinimid-Aktivierung[79]. Im Einzelfall wird durch Vergleich der Ausbeuten die für den jeweiligen Kupplungsschritt beste Methode gewählt.

Da die alkalische Verseifung von Aminosäure- oder Peptidestern oft unter Racemisierung und Bildung von Nebenprodukten verlaufen[80], sollen sie so wenig wie möglich eingesetzt werden.

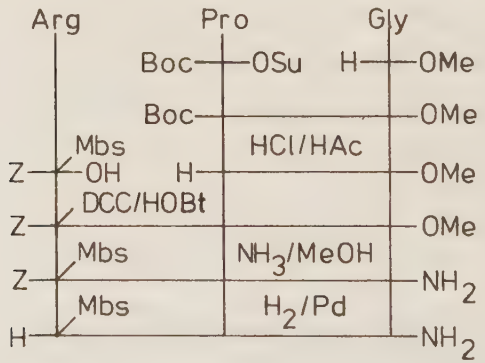
Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, haben alle im folgenden benutzten Aminosäuren die L-Konfiguration.

2.2. Synthese des C-terminalen Tripeptidamids H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2

Ursprüngliches Konzept der Synthese war, das Gonadotropin-"Releasing"-Hormon durch Fragmentkondensation der Fragmente 2 + (4+4) (vgl. Sequenz in Abschnitt 2.1.1) aufzubauen. Dies hätte bei der Vereinigung der beiden großen Fragmente eine Kondensation mit amino-terminalem, freiem

Leucin erfordert. Da hierbei erfahrungsgemäß[81] nur schlechte Ausbeuten erzielt werden, wurde das Synthesekonzept umgestellt auf die Kondensation der Fragmente 2 + (5+3). Bei dieser Vorgehensweise besteht die Möglichkeit, die kleinen, am Imidazol-Rest variierten Pyr-His-Bruchstücke an den gleichbleibenden Octapeptidrest zu kuppeln. Dadurch würden die Histidin - Analoga von Gn-RH leicht zugänglich, da erst im letzten Reaktionsschritt die jeweils veränderte Gruppierung in das Molekül eingeführt wird.

Die Synthese des Fragments 8-10 wird nach dem unten gezeigten Schema durchgeführt.



Syntheseschema 1

Glycin wird zur Kupplung als Methylester eingesetzt, da die Kupplung mit Glycinamid schwer verläuft und nur schlechte Ausbeuten liefert. Die Kondensation wird mit Hilfe des Boc-Pro-N-hydroxysuccinimidesters durchgeführt, da die Ausbeute besser ist als bei Verwendung von DCC/HOBt:

Bei Verwendung von Z-Pro und DCC/HOBt werden nur 78 % erreicht. Boc-Pro-Gly-OMe fällt als farbloses, nicht kristallisierbares Öl an.

Die Umsetzung des Methylesters zum Säureamid kann bereits auf dieser Stufe erfolgen. Sie verläuft bei geschützter N_α-Funktion schnell und vollständig. Setzt man den N_α-ungeschützten Dipeptidmethylester mit MeOH/NH_3 um, so gelingt die Reaktion glatt, das Produkt ist jedoch nicht stabil: Es entsteht eine unpolare Verbindung (Rf_D = 0.46), die in geringen Mengen auch bei der katalytischen Hydrierung von Z-Pro-Gly-NH_2 auftritt. Die Elementaranalyse ergibt 28.75 % C, 7.02 % H und 21.69 % N.

Die Umsetzung zum Peptidamid erfolgt aufgrund dieser Schwierigkeit deshalb erst auf der Stufe des Tripeptids. Abbildung 10b zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Pro-Gly-OMe. Problematisch ist lediglich die Zuordnung von C_δ am Prolin, da das Signal vom CD_3OD-Multiplett überlagert wird [54,55].

Die Abspaltung der Boc-Gruppe mit HCl/HAc (1.2 N) in Gegenwart von Anisol verläuft quantitativ innerhalb von 15 min.

Die Kupplung von Z-Arg(Mbs)-OH an H-Pro-Gly-OMe nach der DCC/HOBt-Methode verläuft glatt und mit guter Ausbeute. Die Umsetzung zum Säureamid gelingt auch mit dem Z-geschützten Tripeptid in quantitativer Ausbeute unter Verwendung von NH_3/MeOH. Die Substanz kann aus MeOH/Ether ausgefällt werden und wird so weiter umgesetzt.

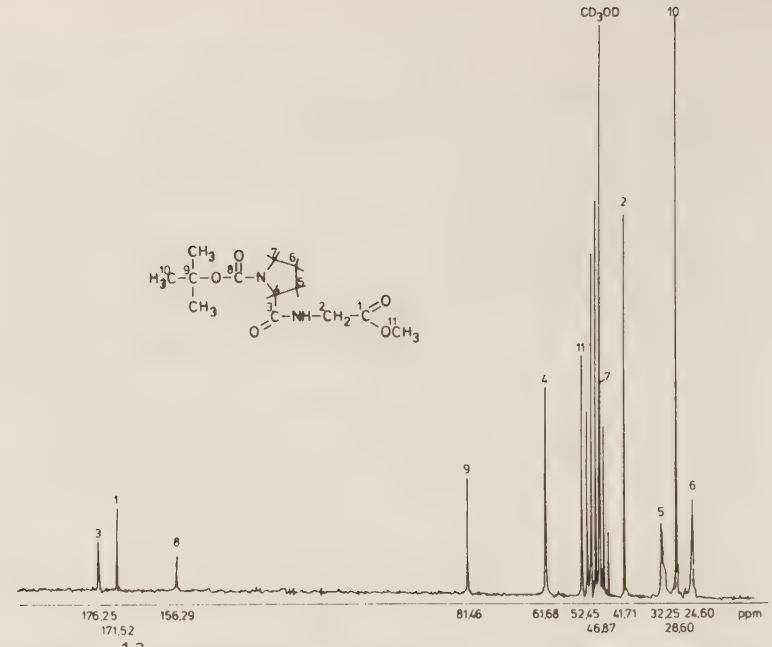


Abb.10b: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Pro-Gly-OMe, 200 mg in CD_3OD, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 30702 Pulsinterferogramme

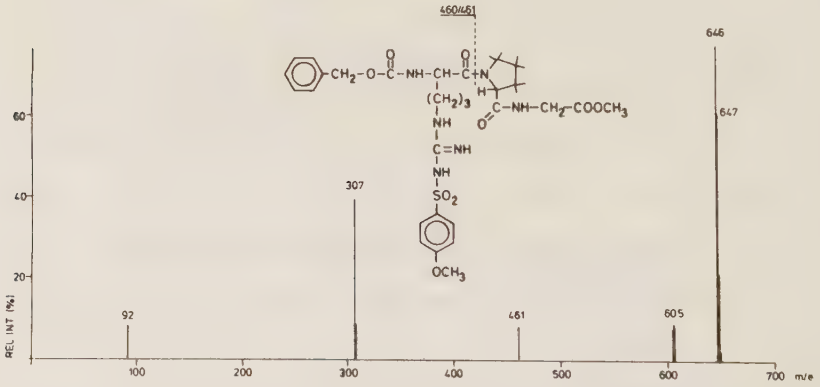


Abb.11: FD-Massenspektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-OMe, 60°C

Eine analytische Probe wird über Kieselgel 60 (240-300 mesh) mit Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5) gereinigt. Das Massenspektrum ergibt den Molekülpeak von 632 (Berechnete Masse: 631.7).

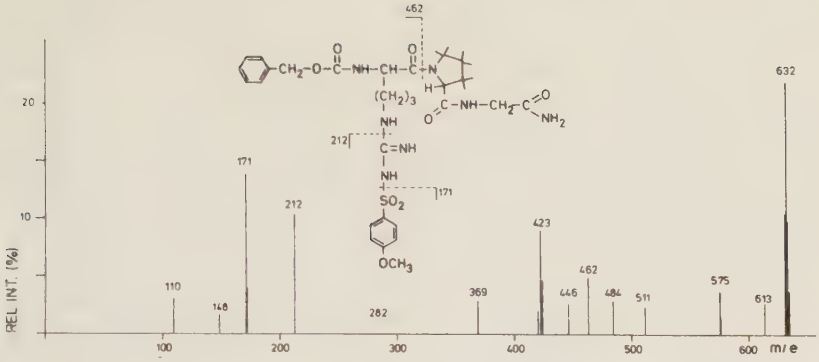


Abb.12: FD-Massenspektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2
Temperatur 60°C

Abbildung 13 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2. Die Resonanzsignale der aromatischen Kohlenstoffatome der p-Methoxybenzolsulfonylgruppe, die charakteristische, von den Benzyl-C-Atomen abweichende chemische Verschiebung zeigen, stimmen gut mit Schätzungen für disubstituierte Aromaten überein[54,55].

	C_{14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}
Geschätzt	136	128	115	164
Gemessen	136.9	129	114.9	163.7

Die N-terminale Carbobenzoxyschutzgruppe wird hydrogenolytisch mit Pd/Aktivkohle bei pH 4.5 abgespalten. Dabei wird der pH laufend kontrolliert und korrigiert, bis die Umsetzung beendet ist. Diese Vorgehensweise hat sich bei Hydrierungen allgemein bewährt, da die Reaktionszeit

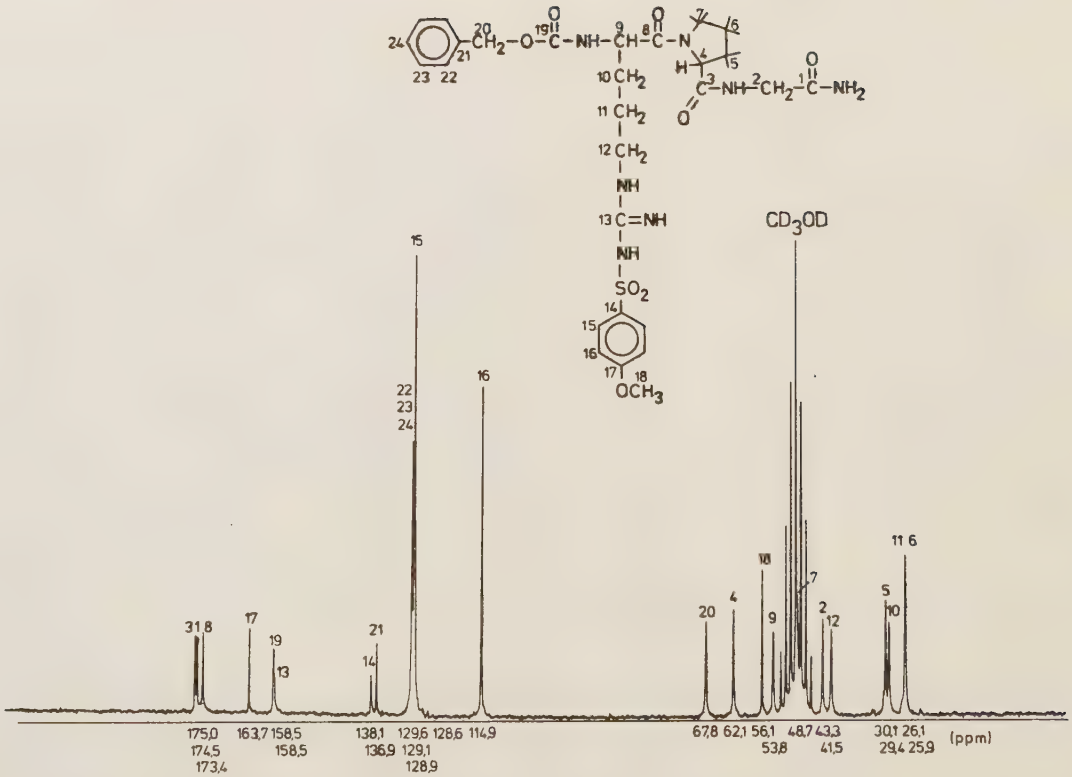


Abb.13: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2; 200 mg in 1 ml CD_3OD; 20.115 MHz; protonenbreitbandentkoppelt, 69063 Pulsinterferogramme

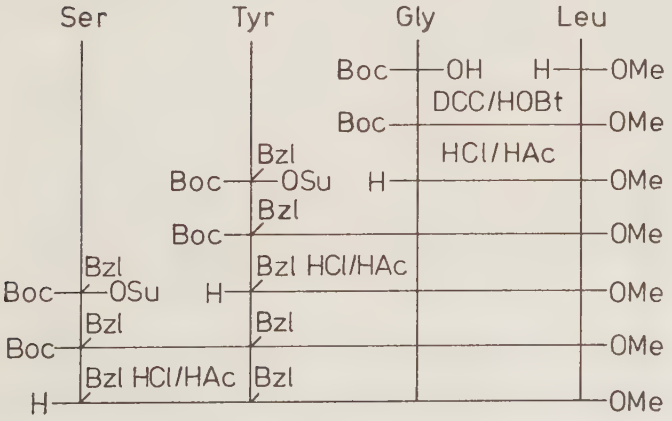
durch korrekte Einhaltung des pH verkürzt wird.

Aminosäurenanalyse (6 N HCl, 110°C, 24 h)

	Arg	Pro	Gly
Berechnet	1.0	1.0	1.0
Gefunden	1.04	0.8	1

2.3. Synthese des Tetrapeptidmethylesters H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe

Die Synthese des Fragments 4-7 wird nach dem unten gezeigten Schema durch schrittweisen Aufbau aus den geschützten Aminosäuren hergestellt.



Syntheseschema 2

Als Carboxylschutzgruppe wird durchgehend die tert-Butyloxycarbonylgruppe verwendet. Ein Vergleich der Ausbeuten des 1.Kupplungsschrittes zeigt für die DCC/HOBt-Methode eine bessere Ausbeute als für den Hydroxysuccinimidester. Sie wird deshalb weiterhin verwendet. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe liefert das Dipeptid als kristallines, gut charakterisierbares Hydrochlorid.

Die Kupplung mit Boc-Ser(Bzl)-N-hydroxysuccinimidester ergibt das geschützte Tripeptid in guter Ausbeute. Im nächsten Kupplungsschritt - nach üblicher Abspaltung der Boc-Gruppe - ist die Ausbeute wohl durch die sterische Hinderung der beiden Benzylethergruppen nicht ganz so gut, doch liefert auch hier die Aktivester-Methode eine bessere Ausbeute als DCC/HOBt.

Abbildung 14 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum des vollständig geschützten Tetrapeptidmethylesters. Durch Spreizung des Spektrums ist auch im Bereich der Aromaten eine Zuordnung der Resonanzsignale möglich[54,55,57].

Das FD-Massenspektrum zeigt gute Übereinstimmung mit der berechneten Masse von 732.88.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nach dem üblichen Verfahren liefert den Tetrapeptidmethylester als farbloses Öl.

Die Beobachtung, die Abspaltung der Benzylether-Funktion sei problematisch[80] kann für dieses Peptid nicht bestätigt werden. Eine kleine Probe des vollständig geschützten Tetrapeptids wird katalytisch hydriert. Nach 2.5 h ist kein Ausgangsprodukt mehr nachweisbar, die beiden Zwischenstufen (entsprechend je einer abgespaltenen Benzylether-

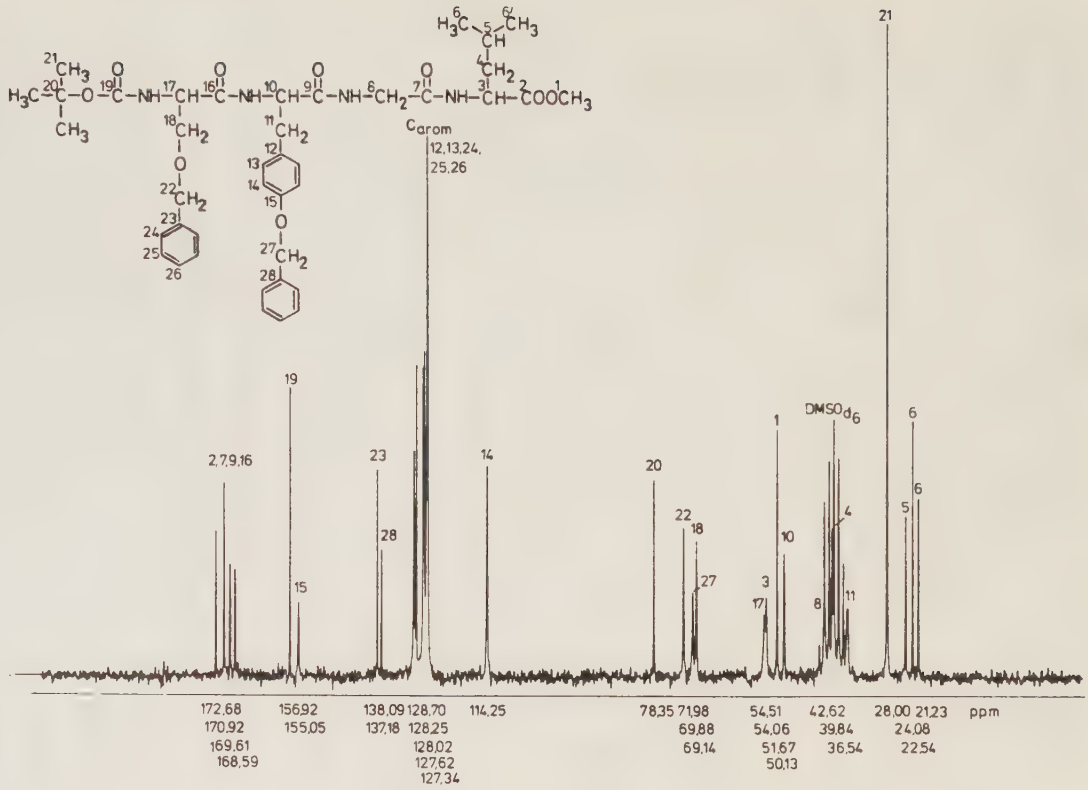


Abb.14: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe, 180 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 37000 Pulsinterferogramme

Funktion) können auf dem Dünnschichtchromatogramm beobachtet werden.

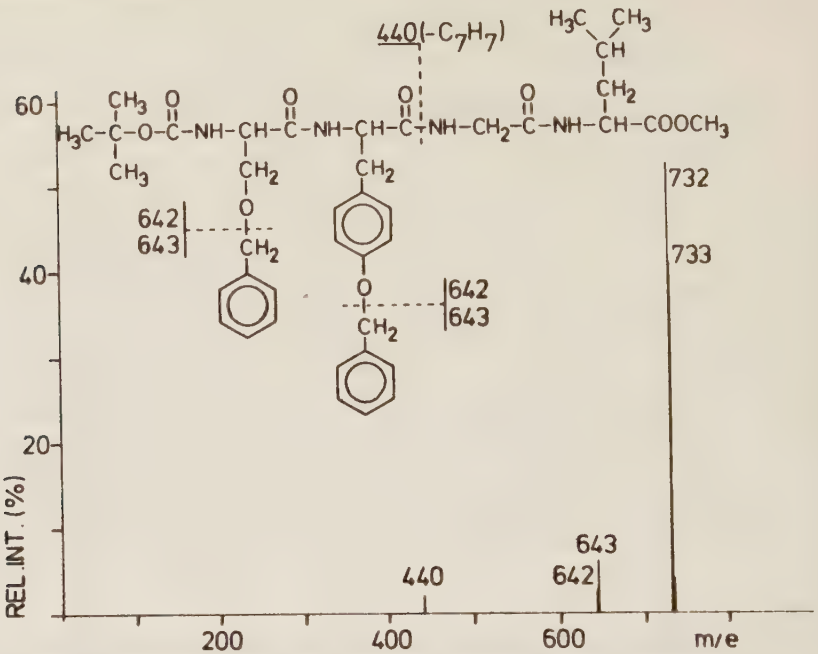
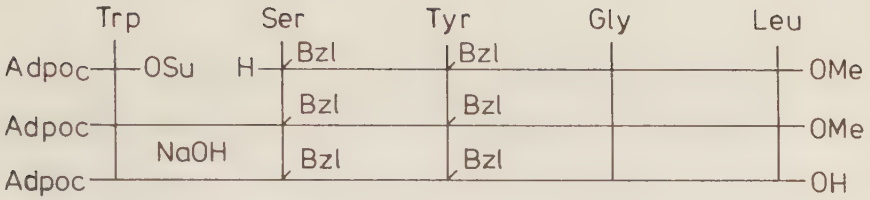


Abb.15: FD-Massenspektrum von Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe; Ionenquellentemperatur 60°C

Aminosäurenanalyse:	Ser	Tyr	Gly	Leu
Berechnet:	1.0	1.0	1.0	1.0
Gefunden:	0.90	0.69	1.0	1.05

2.4. Synthese des Pentapeptidmethylesters Adpoc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe

Die Darstellung in der im Syntheseschema gezeigten Form gelingt nicht. Trotz verlängerter Kupplungszeit und eines Überschusses an Adpoc-Trp-OSu wird nur ein geringfügiger Umsatz beobachtet. Durch Auftrennung auf Kieselgel 60 (Merck Fertigsäule) gelingt es, das freie Tetra-



Syntheseschema 3.

peptid wieder zu isolieren.Um sicherzustellen, daß die eingesetzten Reagenzien reaktionsfähig waren, werden folgende Kontrollversuche angeschlossen:

a) Umsetzung des verwendeten Adpoc-Trp-OSu mit H-Ala-OMe. Die Ausbeute an öligem Dipeptid liegt bei (geschätzt) 60 %.

b) Umsetzung von Boc-Trp-OH mit H-Ser (Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe unter Verwendung von DCC/HOBt. Laut Dünnschichtchromatogramm verläuft die Umsetzung gut, das isolierte Produkt zeigt das erwartete Abspaltungsverhalten. Wegen der möglichen Entstehung von Nebenprodukten bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Säure[68] wird dieser Weg nicht weiter verfolgt. Ausbeute (geschätzt) 40%.

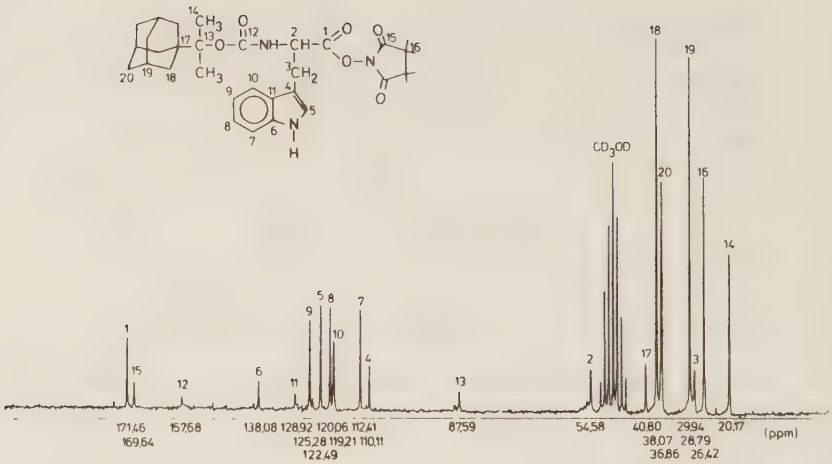
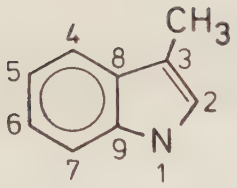


Abb.16: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-L-Trp-OSu; 250 mg in CD_3OD; 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 37468 Pulsinterferogramme

Da die Zuordnung der Kohlenstoffresonanzen des Indolrestes von Tryptophan in den hierfür benutzten Tabellen[54,55] nicht oder nicht eindeutig wiedergegeben ist, werden als Referenz die ^{13}C-Resonanzen von 3-Methylindol[82] verwendet.



ppm

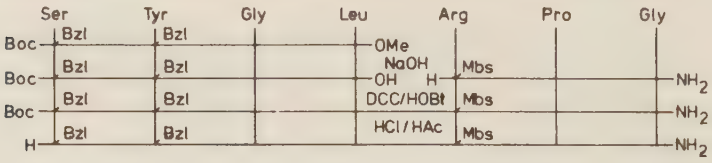
C-Atom	3 Methyl-indol[82]	Tryptophan (Abb.16)
2	122.45	122.49
3	111.15	111.15
4	119.10	119.21
5	121.95	125.28
6	119.30	120.06
7	111.45	112.41
8	128.90	128.92
9	137.00	138.08

Diese Zuordnung entspricht nicht den bisher getroffenen Zuordnungen[73,83].

Dieser Fehlschlag zwingt zur Umstellung der Synthesestrategie (vgl. 41): Kondensation der beiden bereits dargestellten Fragmente 4 + 3 und erneuter Versuch am N-Terminus Adpoc-Trp anzukuppeln, bei negativem Ergebnis sollte eine Fragmentkondensation nach dem Schema 3 + (4 + 3) durchgeführt werden.

2.5. Synthese des Hepapeptidamids

H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2



Syntheseschema 4

Die im Syntheseschema gezeigte Verseifung des Tetrapeptidmethylesters mit 1 N NaOH gelingt ohne sichtbare Nebenreaktionen innerhalb 90 Minuten. Die Charakterisierung des Produkts erfolgt durch FD-Massenspektrum: Die berechnete Masse beträgt 718.8. Das Signal bei M = 743 stellt MNa^+ dar.

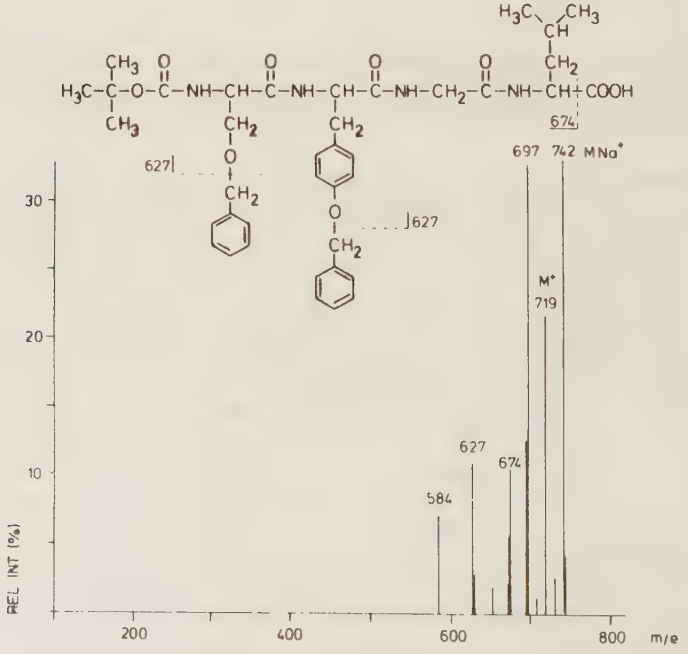


Abb.17: FD-Massenspektrum von Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OH, Ionenquellentemperatur 60°C

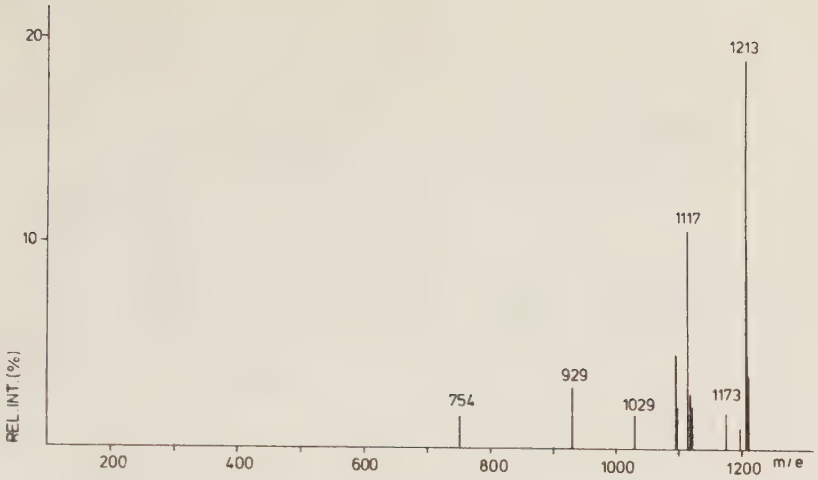


Abb. 18: FD-Massenspektrum von Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2

Die Fragmentkondensation zum geschützten Heptapeptid gelingt mit 55 % Ausbeute unter Verwendung von DCC/HOBt. Das entstehende Produkt wird über Kieselgel 60 gereinigt und durch das FD-Spektrum charakterisiert.

Die berechnete Masse beträgt 1199. Das gefundene M^+-Signal bei m/e = 1213 kann erklärt werden durch Anlagerung von 2 Li, wie es z. B. in Schliffetten vorkommt.

Interpretation von Fragmentionen

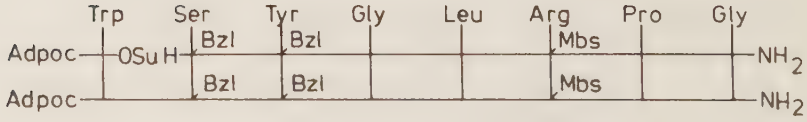
m/e	Fragmention
1029	M^+ - Pro-Gly-NH_2
929	M^+ - Boc, - Pro-Gly-NH_2
754	M^+ - Boc-Ser(Bzl), -Pro-Gly-NH_2

Die Abspaltung der Boc-Gruppe gelingt innerhalb von 15 min. mit HCl/HAc in Gegenwart von Anisol.

Aminosäurenanalyse (nach Hydrolyse mit 6 N HCl, 18 h, 110°C)

	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
Berechnet:	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
Gefunden:	1.0	1.06	2.12	1.05	0.85	0.94

2.6. Synthese des Octapeptidamids Adpoc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2



Syntheseschema 6

Die im Syntheseschema gezeigte Umsetzung zum Octapeptidamid verläuft - wie auch für die analoge Umsetzung in Abschnitt III.2.4. beschrieben - nur mit geringfügigem Umsatz, obwohl ein Überschuß an kupplungsfähigem Adpoc-Trp-OSu eingesetzt wurde.

Nach Extraktion von Adpoc-Trp-OSu mit Ether wird der Rückstand auf eine Si 60 Säule aufgetragen. Es gelingt, das freie Heptapeptid und die auf dem DC mit (1) bezeichnete Substanz rein zu isolieren.

Das FD-Massenspektrum der Substanz (1) ergibt nicht die gewünschte Masse des Octapeptids, sondern nur 1 Signal der Masse 644, das nicht interpretierbar ist.

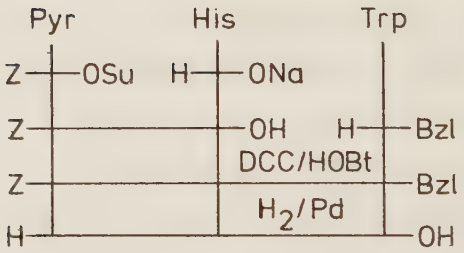
Der Versuch, die Kupplung mit Adpoc-Trp-OH unter Verwendung von DCC/HOBt durchzuführen, bringt kein besseres Ergebnis.

Damit bestätigt sich, was bisher bei allen Kupplungsversuchen mit aminoterminaler Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Funktion beobachtet werden konnte: Die Kupplung verläuft mit schlechten Ausbeuten, bei dem sehr voluminösen Adpoc-geschützten Tryptophan als Partner kann praktisch kein Umsatz beobachtet werden. Auch die später beschriebenen Fragmentkondensation liefert eine schlechte Ausbeute. Ein Schutz der Alkoholfunktion des

Serinsmit einer weniger voluminösen Gruppe liefert vermutlich bessere Ergebnisse.

Dieser Mißerfolg zwingt zum erneuten Abweichen von der ursprünglichen Strategie (III.2.1.1.): Es muß eine Fragmentkondensation 3 + 7 versucht werden.

2.7. Synthese des aminoterminalen Tripeptids H-Pyr-His-Trp-OH



Syntheseschema 7

Die ursprüngliche Absicht, in Analogie zu Syntheseschema 7 den Z-Pyr-His-Trp-Methylester herzustellen, diesen zu verseifen und dann das aminogeschützte Tripeptid zur Fragmentkondensation einzusetzen, erweist sich als nicht vorteilhaft. Die Darstellung des Methylesters verläuft unproblematisch, bei der Verseifung treten aber so viele Nebenprodukte auf, daß die Reinigung aufwendig und die Ausbeute schlecht wird.

Die Darstellung von Z-Pyr-OSu erfolgt nach Zitat[84,85], die Kupplung zum Dipeptid nach [85].

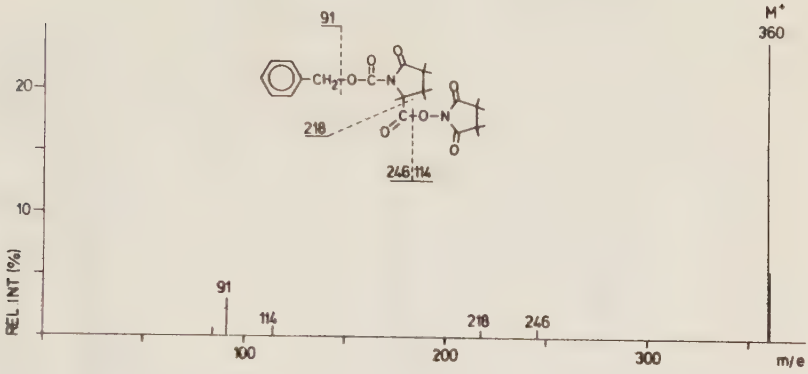


Abb.19: FD-Massenspektrum von Z-Pyr-OSu, Ionenquellentemperatur = 60°C

Das Felddesorptions-Massenspektrum von Z-Pyr-His-OH zeigt als $M+1^+$-Peak die Masse 401, die berechnete Masse beträgt 400.4.

Die Darstellung des L-Trp-Benzylesters nach Referenz[86] unter Verwendung von Phosgen erweist sich als nicht vorteilhaft. Es können nur tief verfärbte und mit Nebenprodukten stark verunreinigte Substanzgemische erhalten werden, die nicht kristallisierbar sind. Der Umweg über das Cäsium-Salz[87] dagegen liefert sehr reines Produkt.

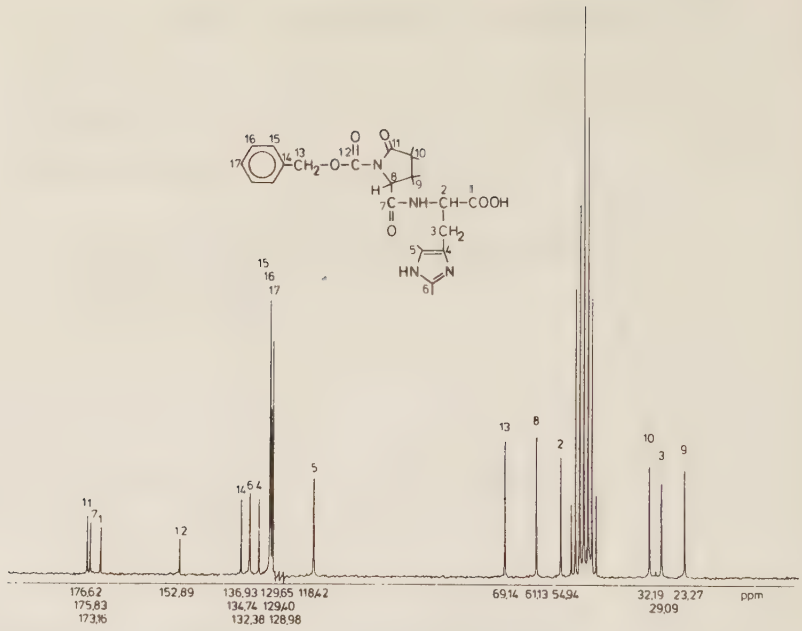


Abb.20: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-His-OH; 250 mg in CD_3OD 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 60871 Pulsinterferogramme

Das freie Tripeptid kann erfolgreich zur Fragmentkondensation eingesetzt werden: Die freie Aminofunktion der Pyroglutaminsäure gibt keinen Anlaß zu Nebenreaktionen. Eine Peptidkupplung mit ungeschützter, N-terminaler Pyroglutaminsäure bewährte sich kürzlich auch bei einer TRH-Synthese ohne Verwendung von Schutzgruppen in unserem Labor[88].

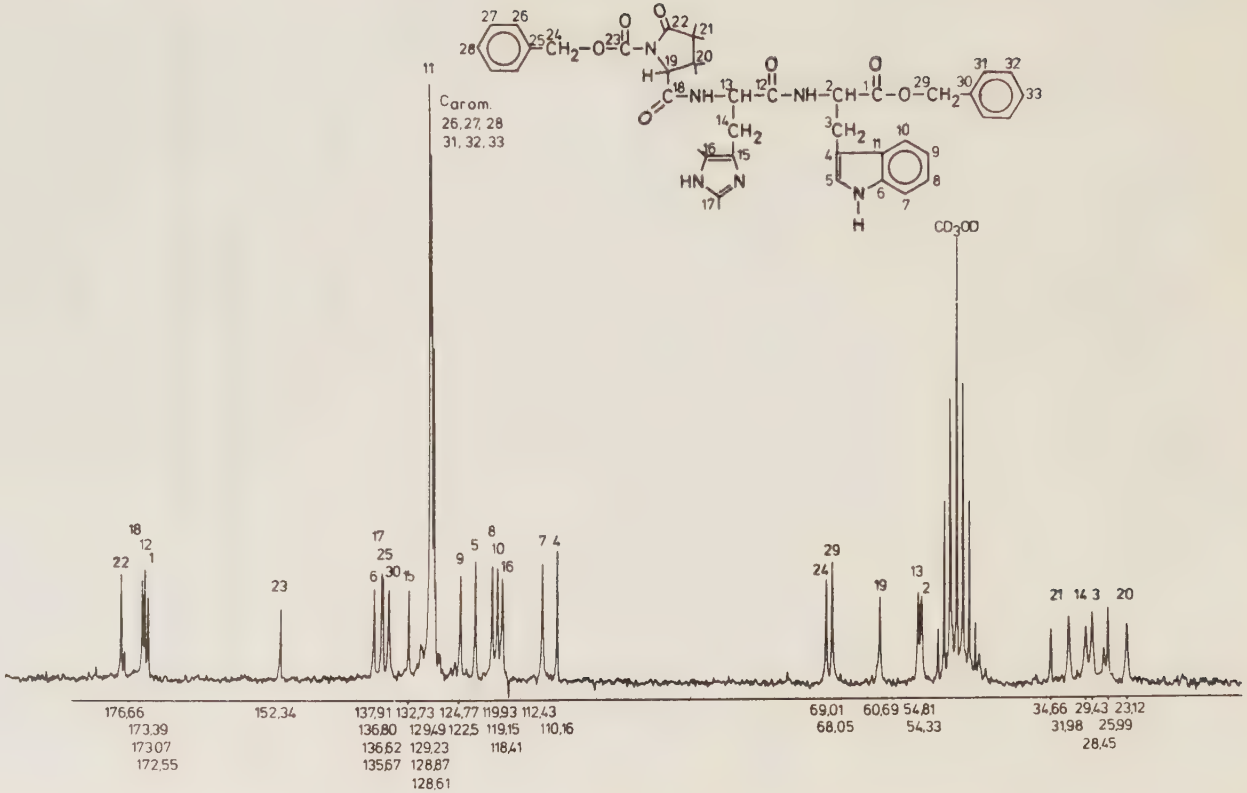


Abb.21: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-His-Trp-OBzl, 200 mg in CD_3OD, 22.63 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

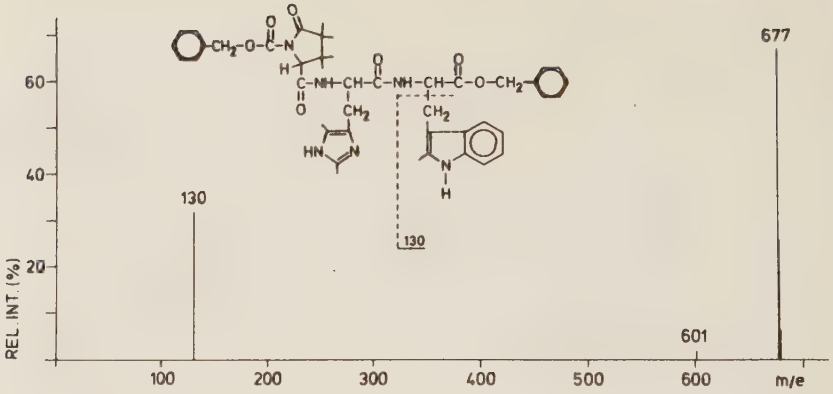


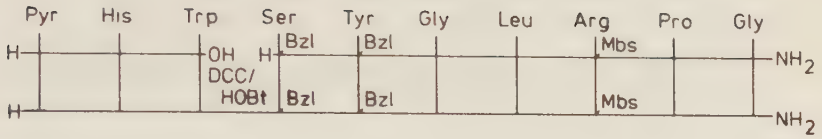
Abb.22: FD-Massenspektrum von Z-Pyr-His-Trp-OBzl, Ionenquellentemperatur = 60°C

Aminosäurenanalyse (Hydrolyse mit 6 N HCl, 18 Stunden bei 110°C)

	Glu	His	Trp
Berechnet:	1.0	1.0	1.0
Gefunden:	1.0	1.02	-

2.8. Synthese des geschützten Dekapeptids H-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2

Die Synthese des geschützten Dekapeptids erfolgt durch Fragmentkondensation nach der DCC-Methode in Analogie zu Zitat [97]. Die Kupplung wird nach 24 h bei Raumtemperatur abgebrochen, obwohl der Umsatz noch nicht vollständig ist. Nach dem Abziehen des Lösungs-



Syntheseschema 8

mittels DMF wird das Gemisch auf Kieselgel 60 (Merck, Fertigsäule, Größe A, 2 x) (Chloroform/Methanol 7:3) aufgetrennt.

Es gelingt, die DC-chromatographisch einheitliche Substanz zu isolieren. Die Aminosäurenanalyse des mit 6 N HCl hydrolysierten Produktes ergibt:

	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
berechnet:	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
gefunden:	0.97	0.98	-	0.95	0.79	2.0	1.0	1.01	0.80

Die Ausbeute (geschätzt laut DC) liegt bei 20-30 %.

Wie bereits weiter vorne geschildert, wird auch hier das Zusammentreffen des amino-terminal stehenden, als Benzylether geschützten Serins mit einem voluminösen Rest an der schlechten Kupplungsausbeute schuld sein. Es wäre noch zu versuchen, anstelle der DCC-Methode zur Fragmentkondensation die besonders ge-

eignete Azid-Methode[89] einzusetzen, ausgehend vom Z-Pyr-His-Trp-OMe, um gerade im letzten Kupplungsschritt eine bessere Ausbeute zu erzielen.

2.9. Peptidsynthese unter Verwendung der N^{τ}-Alkylhistidine

Der Einsatz der in Abschnitt III.1. dargestellten Alkylhistidine bei der Synthese Histidin-analoger Peptide gelingt ohne Schwierigkeiten. Die Synthese der beiden aminoterminal geschützten Dipeptide Z-L-Pyr-L-His(τ-Me)-OH und Z-L-Pyr-L-His (τ-Et)-OH in Analogie zu Syntheseschema 7 unter Verwendung des Z-L-Pyr-N-hydroxysuccinimidesters verläuft glatt und mit guter Ausbeute.

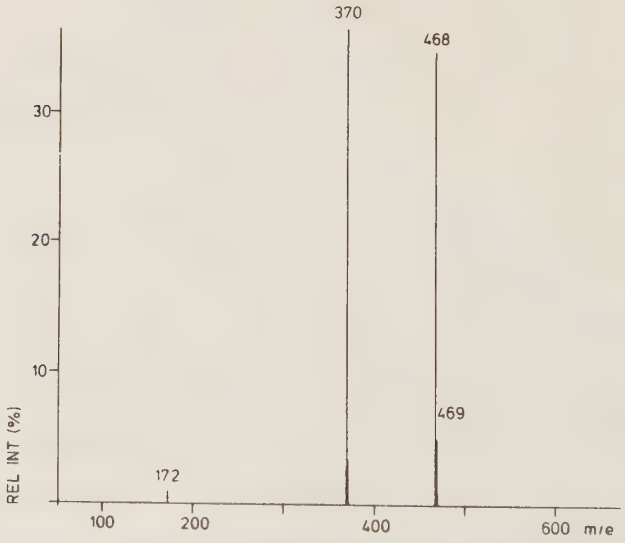


Abb.23: FD-Massenspektrum von Z-Pyr-His(τ-Et)-OH. Berechneter Masse: 428.4. Die gefundene Masse von 468 entspricht $(MH+K)^+$

Damit stehen 2 kupplungsfähige, histidinanaloge Peptidfragmente zur Verfügung, die zur Darstellung von Analogverbindungen z.B. des Thyreoliberins und des Gonadoliberins verwendet werden können.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Methoden

1.1. Chromatographie

Die in der Arbeit beschriebenen Verbindungen wurden dünnschichtchromatographisch auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurden DC-Fertigplatten 60 F_{254} der Fa. E.Merck, Darmstadt, in den folgenden Fließmittelsystemen verwendet:

A: n-Butanol/Eisessig/Wasser, (3:1:1)

D: Chloroform/Benzol/Methanol/Wasser (40:40:40:5)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte unter Verwendung von Ninhydrinlösung[90] oder o-Tolidinlösung nach der Behandlung mit Chlor[90].

Die chromatographische Reinigung der Substanzen erfolgte auf Kieselgel-Fertigsäulen der Fa.E.Merck, Darmstadt, (Lobar-Fertigsäule Größe A (240-10) und Größe B (310-25), LiChroprep Si 60, 40-63 µm. Als Mitteldruckpumpe wurde das Modell A 2001 der Fa.CFG,Heidelberg, verwendet. Die Probenaufgabe erfolgte über ein Hochdruckinjektionssystem Modell 7125 der Fa.Rheodyne, Berkeley, Californien; ein Fraktionssammler der Firma LKB, Stockholm (Typ Ultrorac 7000) in Verbindung mit einem Durchflußphotometer (Uvicord II) und einem Schreiber (Typ 652o-4) derselben Firma wurde verwendet.

1.2. Spektroskopische Methoden

1.2.1. Kernresonanzspektroskopie

^{1}H-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WH 90-Gerät (Fa.Bruker, Karlsruhe) gemessen. Die Aufnahme der PFT-^{13}C-NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker HFX-90-Multikernspektrometer (22.63 MHz für ^{13}C). Dabei wurden die Spektren durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (Impulsbreite 2.5 - 3.5 µsec, 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation des akkumulierten Interferogramms erhalten (BNC-28 Rechner).

Ein Teil der ^{13}C-Spektren wurde mit einem WP 80-Kernresonanzspektrometer (20.115 MHz) der Fa.Bruker, Karlsruhe, aufgenommen.

1.2.2. Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Elektronenstoßionisations-Massenspektren erfolgte an einem Gerät der Fa.Varian, Bremen (MAT 711) unter Verwendung eines Direkteinlaßsystems (Elektronenenergie 70 eV, Ionenquellentemperatur jeweils angegeben). Die Felddesorptions-Massenspektren der Peptide wurden am selben Gerät unter Verwendung einer FD-Ionenquelle aufgenommen. Die Ionenquellentemperatur ist jeweils angegeben.

1.2.3. Drehwerte

Die Drehwerte wurden an einem Zeiss OLD 5 Polarimeter gemessen. Der $[\alpha]_D^{20}$-Wert wurde durch graphische Extrapolation der bei 578, 546, 436, 405 und 365 nm gemessenen Einzelwerte ermittelt.

1.2.4. Sonstige Geräte

Schmelzpunkte wurden auf einem Gerät nach Dr.Tottoli der Fa.Büchi,Flavil,Schweiz (Typ Büchi 510) gemessen und sind nicht korrigiert.
pH-Werte wurden mit dem pH-Meter E 512 der Fa.Metrohm, Bad Herisau,Schweiz, gemessen; in Kombination mit dem Impulsomat E 473 derselben Firma diente er auch als pH-Stat.

Aminosäurenanalysen wurden an einem automatischen Chromatographiesystem der Fa.Biotronik,Frankfurt (LC 6000 E) und an einem Beckman Unichrom Analysator durchgeführt. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Hydrolyse mit 6 N HCl, 24 Stunden, 110°C in Ampullen (zugeschmolzen in der Kälte unter Vakuum) bzw. in reacti-vials (unter N_2-Sättigung). Nach dem Abziehen wurden die Proben in Pufferlösung aufgenommen.

Für die Racematteste wurden die Proben nach Hydrolyse (s.o.) durch Veresterung mit Propanol und Acylierung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid derivatisiert. Die Messung erfolgte dann mit Hilfe eines Gaschromatographen.

1.2.5. Chemikalien

Die gängigen Lösungsmittel wurden nach üblichen Verfahren getrocknet und über eine 60 cm lange Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Die Aufbewahrung erfolgte über Molekularsieben mit 3 bzw. 4 Å. Aminosäuren wurden von der Fa.Merck bezogen.

Sie hatten - außer wenn es ausdrücklich erwähnt wird und von Glycin abgesehen - alle L-Konfiguration. D-Histidin, Boc-L-Ser(Bzl) und 1-Hydroxybenzotriazol wurden von der Fa.Fluka,Buchs bezogen. Die verwendeten Phasentransfer-Katalysatoren kamen von Merck (Benzyltriethylammoniumchlorid und 18-Krone-6) und Fluka (Tetrabutylammoniumhydroxid).

Die übrigen Chemikalien wurden von der Fa.Merck bezogen und hatten Synthese- oder Analysenqualität.

Folgende Ausgangsverbindungen wurden nach den in den Literaturstellen angegebenen Verfahren hergestellt: tert.-Butyloxycarbonylazid (Boc-Azid) aus Carbazinsäure-tert.-butylester und Natriumnitrit in Eisessig[91]; Benzyloxycarbonylchlorid aus Phosgen und Benzylalkohol[92]; p-Methoxybenzolsulfonylchlorid aus Anisol und Chlorsulfonsäure[93].

Die einzelnen Boc-Aminosäuren wurden nach Schnabel[94] am pH-Stat aus Boc-Azid und der jeweiligen Aminosäure in Dioxan/Wasser hergestellt. Die genauen Bedingungen (pH, Zeit) finden sich in der Literatur. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit Essigester überschichtet, angesäuert, wie üblich gewaschen und aus Essigester/Petrolether kristallisiert.

Adpoc-Fluorid zur Darstellung von Adpoc-L-Trp wurde von Herrn Horn zur Verfügung gestellt.

Zur Berechnung der Molekulargewichte wurden die folgenden Atomgewichte verwendet:

C = 12.011; H = 1.008; N = 14.007; O = 15.999;

S = 32.064; Cl= 35.453.

2. Arbeitsvorschriften

2.1. Synthese der N^{τ}-Alkylhistidine

L-Histidin-methylester.2 Hydrochlorid (H-L-His-OMe.2HCl)

Die Darstellung der Verbindung erfolgt nach Referenz[95]. (Ansatz: 60 g (0.31 Mol L-Histidinhydrochlorid). In Abweichung der Vorschrift wird so lange unter Rückfluß erhitzt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Dann wird noch 2 Stunden lang trockenes Salzsäuregas eingeleitet.

Ausbeute: 64 g (85 % d.Th.)

Fp.: 198-200°C, Lit. 200-201°C[95]

Rf_A: 0.19, Rf_D: 0.08

$[\alpha]_D^{20}$: +16.2°(c=1,MeOH), Lit. $^{20}_{D}$:+16.0°(c=1,MeOH)[95]

$C_7H_{13}N_3O_2Cl_2$ (242.106) Ber: C 34.72 H 5.41 N 17.35 Cl 29.28

Gef: C 34.41 H 5.38 N 17.42 Cl 28.85

L-Histidin-methylester (H-L-His-OMe)

12.1 g (0.05 Mol) kristallines L-Histidinmethylesterdihydrochlorid wird im Mörser fein zerrieben und in 150 ml absolutem Chloroform suspendiert. Dann leitet man unter Eiskühlung 10 Minuten lang trockenes Ammoniakgas ein und filtriert das ausgefallene Ammoniumchlorid ab. Die klare Chloroformphase wird im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der als farbloses Öl anfallende freie Methylester wird kühl und dunkel gelagert.

Ausbeute: 8.45 g (quantitativ)

Die Verbindung wird ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

(+)-(S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxo-imidazo-[1.5-c]pyrimidin

3.38 g (20 mMol) L-Histidinmethylester und 3.16 g (40 mMol) Pyridin (destilliert über Ninhydrin) werden in 100 ml Chloroform gelöst und mit Methanol/Trockeneis auf -40 bis -50°C gekühlt. Bei dieser Temperatur leitet man für 15 Minuten einen schwachen Strom HCl-freies Phosgen ein und rührt noch 15 Minuten in der Kälte. Dann gießt man den Ansatz in 400 ml kalten Ether/Hexan (2:1). Es fällt ein feiner, weißer, leicht zerfließender Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Ether gewaschen wird. Der Niederschlag wird in 200 ml 1 N Natriumbicarbonatlösung aufgenommen und 6 mal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die $CHCl_3$-Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Verbleibende Spuren von Pyridin werden im Hochvakuum entfernt. Die Substanz kristallisiert aus Methanol in schönen, farblosen Kristallen.

Ausbeute: 2.88 g (74 % d.Th.)

Fp.: 160-162°C, Lit.156-157°C [53]

Rf_A: 0.41, Rf_D: 0.53

$[\alpha]_D^{25}$: +56° (c=1.2,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +59° (c=1.2,MeOH) [53]

$C_8H_9N_3O_3$ (195.178) Ber: C 49.23 H 4.62 N 21.54

Gef: C 49.36 H 4.71 N 21.21

(+)-(S)-2-Methyl-5,6,7,8-tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxoimidazo[1.5-c]pyrimidin·Hydroiodid

3 g (15.3 mMol) des 5,6,7,8-Tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxoimidazopyrimidins werden in 30 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und mit 9.34 ml (150 mMol) frisch destilliertem Methyliodid versetzt. Man kocht 2.5 Stunden unter Rückfluß, läßt auf Zimmertemperatur abkühlen und gießt in 150 ml Ether. Die kristalline Verbindung wird abgesaugt, mit wenig kaltem Methanol und Ether gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Die Substanz sollte unter Lichtschutz und in der Kälte aufbewahrt werden.

Ausbeute: 4.7 g (91 % d.Th.)

Fp.: 171-172°C, Lit. 162°C [53]

Rf_A: 0.16 , Rf_D: 0.08

$[\alpha]_D^{25}$: +33° (c=0.5,H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +46° (c=0.7,H_2O) [53]

$C_9H_{12}N_3O_3J$ (337.113) Ber: C 32.06 H 3.58 N 12.46

Gef: C 31.95 H 3.62 N 12.46

L-N^{τ}-Methylhistidin·2 Hydrochlorid (H-L-His(N^{τ}-Me)OH·2 HCl)

3.37 g (10 mMol) (+)-(7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-2-methyl-5-oxoimidazo[1.5-c]pyrimidin·Hydroiodid wird in 40 ml 6 N HCl so lange unter Rückfluß erhitzt, bis durch Dünnschichtchromatographie keine Ausgangsverbindung mehr nachweisbar ist (6-8 Stunden).Die

Salzsäure wird dann im Vakuum abgezogen, der ölige Rückstand in Ethanol aufgenommen und durch Zugabe von Ether kristallisiert.

Ausbeute: 2.0 g (83 % d.Th.)

Fp.: 258°C, Lit. 258-259°C[96]

Rf_A: 0.04 Rf_D: 0.02

$[\alpha]_D^{25}$: +5.9° (c=2,H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{21}$: +8°(c=2.7, H_2O)[53]

$C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2\,HCl$ (242.106)

Ber: C 34.73 H 5.41 N 17.36 Cl 29.28

Gef: C 34.09 H 5.54 N 16.54 Cl 29.93

(+)-(7S)-2-Ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxoimidazo[1.5-c]pyrimidin.Hydroiodid

3.9 g (20 mMol) des (7S)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxoimidazopyrimidins werden mit 31.1 g (200 mMol) frisch destilliertem Ethyliodid und 40 ml absolutem Dimethylformamid 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Dann läßt man auf Raumtemperatur abkühlen und gibt Ether zu, bis eine Trübung eintritt. Das Produkt fällt bei 4°C in Form gelber Kristalle an und wird aus Methanol umkristallisiert. Die Verbindung sollte dunkel und kühl gelagert werden, da bei Licht Dunkelfärbung und Zersetzung eintritt.

Ausbeute: 5.54 g (79 % d.Th.)

Fp.: 140°C(Zersetzung), Lit. 146°C (decomp.)[53]

Rf_A: 0.16 Rf_D: 0.11

$[\alpha]_D^{23}$: +22.8° (c=1.5,H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +35°(c=2.3,H_2O)[53]

$C_{10}H_{14}N_3O_3J$ (351.14) Ber: C 34.19 H 3.99 N 11.97

Gef: C 34.00 H 3.97 N 12.03

L-N^{τ}-Ethyl-histidin · 2 Hydrochlorid (H-L-His (N^{τ}-Et)-OH·2 HCl)

1.75 g (5 mMol) des nach obiger Vorschrift dargestellten (+)-(7S)-2-Ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-7-(methoxycarbonyl)-5-oxoimidazopyrimidin·HI werden in 20 ml 6 N Salzsäure 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Dann wird die Salzsäure im Hochvakuum vollständig entfernt, der rot gefärbte, ölige Rückstand in Ethanol aufgenommen, getrocknet und durch Zugabe von Ether kristallisiert.

Ausbeute: 0.97 g (76 % d.Th.)

Fp.: 235°C, Lit. 237-240°C[53]

Rf_A: 0.09 Rf_D: 0.05

$[\alpha]_D^{25}$: +4.5°(c=1,H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +6°(c=1.6, H_2O)[53]

$C_8H_{15}N_3O_2Cl_2$ (256.15) Ber: C 37.51 H 5.90 N 16.41 Cl 27.68

Gef: C 37.33 H 5.81 N 16.22 Cl 28.41

Ergebnis des Racemattests:

N^{τ}-Methyl-L-histidin: nicht eindeutig zuzuordnen, gering

N^{τ}-Ethyl-L-histidin: gering

(-)-(R)-5,6,7,8-Tetrahydro-7-methoxycarbonyl-5-oxo-imidazo-(1.5-c)-pyrimidin

Man löst 1.7 g (10 mMol) D-Histidinmethylester und 1.58 g (20 mMol, 1.61 ml) destilliertes Pyridin in 50 ml absolutem Chloroform, kühlt mit Methanol/Trockeneis auf -40 bis -50°C und leitet bei dieser Temperatur für 15 Minuten einen schwachen Strom HCl-freies Phosgen ein. Man rührt noch 15 Minuten in der Kälte und gießt in 200 ml kalten Ether/Hexan (2:1) ein. Es fällt ein weißer, zerfließlicher Niederschlag, der rasch abgesaugt und mit Ether gewaschen wird. Der Niederschlag wird in 100 ml 1 N Na_2CO_3-Lösung aufgenommen und 6 mal mit Chloroform extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abgezogen, eventuell vorhandene Spuren von Pyridin werden im Hochvakuum entfernt. Die Substanz kristallisiert aus Methanol.

Ausbeute: 1.16 g (68 % d.Th.)

Fp.: 164°C

Rf_A: 0.41 Rf_D: 0.57

$[\alpha]_D^{22}$: -59.9° (c=1, MeOH)

$C_8H_9N_3O_3$ (195.178) Ber: C 49.23 H 4.62 N 21.54

Gef: C 49.34 H 4.75 N 21.42

2.2. Synthese des C-terminalen Tripeptidamids H-L-Arg (Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2

N_α-Benzyloxycarbonyl-L-arginin (Z-L-Arg-OH)

Die Verbindung wird hergestellt aus L-Arg·HCl und Chlorameisensäurebenzylester nach Vorschrift[98].

Ausbeute: 76.9 g (82.7 % d.Th.)

Fp.: 176°C, Lit. 184°C[98]

Rf_A: 0.78 Rf_D: 0.58

$[\alpha]_D^{23}$: -9.6° (c=2, 1N HCl), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -9.3° ± 0.5° (c=2, 1 N HCl)[98]

$C_{14}H_{20}N_4O_4$ (308.338) Ber: C 54.53 H 6.54 N 18.17
Gef: C 54.14 H 6.52 N 17.86

N_α-Benzyloxycarbonyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginin (Z-L-Arg(Mbs)-OH)

6.16 g (20 mMol)Z-L-Arg-OH werden unter Erwärmen in 20 ml 4 N HCl und 150 ml Aceton gelöst und auf 0°C gekühlt. Unter starkem Rühren tropft man eine Lösung von 8.26 g (40 mMol) p-Methoxybenzolsulfonylchlorid[93] in 30 ml Aceton zu. Man rührt noch 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dann wird mit konz.Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und bei 40°C im Vakuum eingeengt. Das zurückbleibende Öl löst sich (nach Zugabe von Wasser) in Essigester und wird zweimal mit Wasser gewaschen. Die Essigesterphase wird dreimal mit 50 ml 5%iger $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Der wäßrige Extrakt wird mit konz.Zitronensäure auf pH 3 gebracht, das sich abscheidende Öl mit

Essigester extrahiert. Die EE-Phase wird zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und bei 40°C einrotiert. Die Substanz fällt als farbloses Öl an, das nach dünnschichtchromatographischer Reinheitskontrolle weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 9.2 g (96 % d.Th.), Lit. 100 %[99)]

Rf_A: 0.70 Rf_D: 0.33

$C_{21}H_{26}N_4O_7S$ (478.524)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolin (Boc-L-Pro-OH)

Boc-L-Pro-OH wird aus 57.6 g (0.5 Mol) L-Prolin und 79 ml (0.55 Mol) Boc-Azid nach Schnabel[94)] hergestellt.

Ausbeute: 88 g (81.7 % d.Th.)

Fp.: 138°C, Lit. 136-137°C [94)]

Rf_A: 0.77 Rf_D: 0.44

$[\alpha]_D^{20}$: -61.9° (c=2,HAc), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -60.2° (c=2,HAc)[94)]

$C_{10}H_{17}NO$ (215.249) Ber: C 55.83 H 7.96 N 6.51

Gef: C 56.02 H 8.05 N 6.57

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolin-(N-hydroxysuccinimid)-ester (Boc-L-Pro-OSu)

8.61 g (40 mMol) Boc-L-Pro-OH und 4.60 g (40 mMol) N-Hydroxysuccinimid werden in 40 ml Ethylenglycoldimethylether gelöst und mit Aceton/Trockeneis auf -20°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden 8.17 g Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in wenig Ethylenglykoldimethylether, zugefügt. Man rührt eine Stunde in der Kälte und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene

N,N'-Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt und mit wenig Lösungsmittel gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen, der farblose Rückstand aus absolutem Propanol-2 kristallisiert.

Ausbeute: 9.27 g (74.2 % d.Th.)

Fp.: 134°C, Lit. 135-136°C[100)]

Rf_A: 0.48 Rf_D: 0.37

$[\alpha]_D^{23}$: -53.1° (c=2, 1.4-Dioxan), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -55.3° (c=2, 1.4-Dioxan)[100)]

$C_{14}H_{20}N_2O_6$ (312.322) Ber: C 53.84 H 6.45 N 8.97

Gef: C 54.13 H 6.63 N 8.92

Glycin-methylester·Hydrochlorid (H-Gly-OMe·HCl)

H-Gly-OMe·HCl wird nach Zitat[101)] aus Glycin mit Thionylchlorid in absolutem Methanol hergestellt.

Ausbeute: 88 % d.Th.

Fp.: 186°C, Lit. 175°C [102)]

Rf_A: 0.50 Rf_D: 0.22

$C_3H_8NO_2Cl$ (125.559) Ber: C 28.69 H 6.42 N 11.15 Cl 28.23

Gef: C 29.17 H 6.69 N 11.11 Cl 28.38

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-glycin-methylester (Boc-L-Pro-Gly-OMe)

3.12 g (25 mMol) H-Gly-OMe·HCl und 7.8 g (25 mMol) Boc-L-Pro-OSu werden in 40 ml DMF gelöst, mit 2.8 ml (25 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab, nimmt

den öligen Rückstand in Essigester auf, wäscht sauer (3 x, 1 N Zitronensäure), basisch (3 x, 5 % Natriumbicarbonat) und schließlich mit Wasser neutral. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Essigester im Hochvakuum abgezogen. Die Substanz bleibt in reiner Form als farbloses, zähes Öl zurück.

Ausbeute: 6.57 g (92 % d.Th.)

Rf_A: 0.70 Rf_D: 0.60

$[\alpha]_D^{22}$: -64.5^o (c=1, MeOH)

$C_{13}H_{22}N_2O_5$ (286.332) Ber: C 54.53 H 7.74 N 9.78

Gef: C 54.66 H 7.75 N 9.94

L-Prolyl-glycin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Pro-Gly-OMe·HCl)

20 g (0.07 Mol) Boc-L-Pro-Gly-OMe werden mit 150 ml HCl/Eisessig (1.2 N) und 20 ml Anisol übergossen und 15 Minuten gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt quantitativen Umsatz. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum abgezogen, bis kein Anisol-Geruch mehr wahrnehmbar ist. Die ölige Substanz wird nach dünnschichtchromatographischer Reinheitskontrolle ohne weitere Charakterisierung zur Kupplung eingesetzt.

Ausbeute: quantitativ

Rf_A: 0.21 Rf_D: 0.24

N_{α}-Benzyloxycarbonyl-N_{G}-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycin-methylester (Z-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-OMe)

3.58 g (7.5 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OH werden in 40 ml absolutem DMF gelöst, auf -10°C gekühlt und mit 1.7 g (8.2 mMol) DCC und 1.01 g (7.5 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol versetzt. Dann gibt man eine gekühlte Lösung von 1.67 g (7.5 mMol) H-L-Pro-Gly-OMe·HCl und 0.84 ml (7.5 mMol) N-Methylmorpholin in wenig DMF zu, rührt 2 Stunden in der Kälte und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs in der Kälte und Abziehen des Lösungsmittels bei -40°C im Hochvakuum wird das Produkt in 300 ml Essigester aufgenommen, wie üblich sauer (3 x, 1 N Zitronensäure), alkalisch (3 x, 5 % Natriumbicarbonat) und neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Durch zweimaliges Umfällen aus Ethanol/Ether erhält man ein feinkristallines, weißes Produkt.

Ausbeute: 4.3 g (88.6 % d.Th.)

Fp.: 82°C

Rf_A: 0.70 Rf_D: 0.64

$[\alpha]_D^{25}$: -28.6° (c=1, MeOH)

$C_{29}H_{38}N_6O_9S$ (646.72) Ber: C 53.86 H 5.92 N 12.99 S 4.96

Gef: C 53.09 H 6.03 N 12.64 S 5.24

N_α-Benzyloxycarbonyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2)

Man löst 0.96 g (1.5 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-OMe in 25 ml absolutem Methanol, kühlt auf 0^oC und leitet 30 Minuten einen trockenen Ammoniakstrom ein. Dann läßt man auf Raumtemperatur erwärmen. Nach einer Stunde zeigt das DC vollständigen Umsatz. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und das Produkt aus Ethanol/Ether kristallisiert oder durch Umfällen aus Methanol/Ether als weißes, leicht zerfließendes Pulver erhalten.

Ausbeute: 0.91 g (quantitativ)

Fp.: 100-102°C

Rf_A: 0.48 Rf_D: 0.55

$[\alpha]_D^{20}$: -27.2° (c=1, MeOH)

$C_{28}H_{37}N_7O_8S$ (631.709) Ber: C 53.23 H 5.90 N 15.52 S 5.07

Gef: C 52.88 H 5.86 N 14.76 S 5.48

N_G-(p-Methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid·Acetat (H-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2·HAc)

900 mg (1.42 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 werden in 30 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 250 mg Pd/Aktivkohle (10 %) und ca. 2 ml Wasser. Man leitet etwa 2 Stunden einen schwachen Wasserstoffstrom ein und hält dabei durch Zugabe von Eisessig den pH auf 4.5. Nach vollständiger Umsetzung (DC) wird die Aktivkohle über Celite abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Um letzte Spuren

von Wasser und Essigsäure zu entfernen, wird noch dreimal mit Methanol aufgenommen und im Hochvakuum eingeengt. Nach dem Trocknen über KOH wird das Produkt in 3 ml Methanol aufgenommen und aus 50 ml Ether/Hexan (5:1) ausgefällt.

Ausbeute: 700 mg (88.6 % d.Th.)

Fp.: 108-110°C

Rf_A: 0.29 Rf_D: 0.07

$C_{22}H_{35}N_7O_8S$ (557.609) Ber: C 47.10 H 6.28 N 17.47 S 6.31

Gef: C 47.16 H 6.50 N 16.52 S 5.67

Aminosäurenanalyse:	Arg	Pro	Gly
Ber:	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.04	0.8	1.0

2.3. Synthese des Tetrapeptids L-(Benzyl)-seryl-L-(benzyl)-tyrosyl-glycyl-L-leucin-methylester (H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe

L-Leucinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Leu-OMe·HCl)

Die Darstellung erfolgt nach Zitat[103] aus L-Leucin in absolutem Methanol unter Verwendung von Thionylchlorid. Ansatz: 39.05 g L-Leu (0.3 Mol).

Ausbeute: 50.1 g (92 % d.Th.)

Fp.: 150°C, Lit. 153°C[104]

Rf_A: 0.48 Rf_D: 0.70

$[\alpha]_D^{20}$: +21°(c=1, MeOH), Lit.$[\alpha]_D^{20}$: +12.7°(c=2, H_2O) [104]

$C_7H_{16}NO_2Cl$ (181.663) Ber: C 46.28 H 8.33 N 7.71 Cl 19.51

Gef: C 46.05 H 8.28 N 7.90 Cl 19.72

N-tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin (Boc-Gly-OH)

Boc-Glycin wird nach Schnabel[94] aus 30.04 g (0.3 Mol) Glycin und 51.5 g (0.36 Mol) Boc-Azid hergestellt.

Ausbeute: 44.1 g (84 % d.Th.)

Fp.: 92°C, Lit. 94-95°C[94]

Rf_A: 0.51 Rf_D: 0.30

$C_7H_{13}NO_4$ (175.184) Ber: C 47.99 H 7.84 N 7.99

Gef: C 48.08 H 7.49 N 8.07

O-Benzyl-L-tyrosin (H-L-Tyr(Bzl)-OH)

Die Substanz wird nach Zitat[105] durch Veretherung des L-Tyrosin-Kupfer(II)-Komplexes mit Benzylbromid dargestellt.

Ausbeute: 52 % d.Th.

Fp.: 218-222°C, Lit. 227-230°C[105]

Rf_A: 0.46 Rf_D: 0.32

$[\alpha]_D^{20}$: -14.1°(c=1,1 N NaOH), Lit.$[\alpha]_D^{25}$: -10.7° (c=0.75, 1N NaOH)[105]

$C_{16}H_{17}NO_3$ (271.316) Ber: C 70.83 H 6.31 N 5.16

Gef: C 69.55 H 6.22 N 5.30

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin(Boc-L-Tyr-(Bzl)-OH)

Die Verbindung wird nach Schnabel[94] aus O-Benzyl-L-tyrosin und Boc-Azid am Autotitrator hergestellt.

Ansatz: 27.2 g (0.1 Mol) H-L-Tyr(Bzl)-OH

Ausbeute: 21.5 g (58 % d.Th.)

Fp.: 111°C, Lit. 108-109°C[106]

Rf_A: 0.78 Rf_D: 0.54

$[\alpha]_D^{20}$: +28.2° (c=2,EtOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +27.6°(c=2,EtOH)[106]

$C_{21}H_{25}NO_5$ (371.433) Ber: C 67.91 H 6.78 N 3.77

Gef: C 67.06 H 6.76 N 3.74

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin-N-hydroxy-succinimidester (Boc-L-Tyr(Bzl)-OSu)

Boc-L-Tyr(Bzl)-OSu wird aus Boc-L-Tyr(Bzl)-OH, N-Hydroxy-succinimid und Dicyclocarbodiimid in Dioxan nach Referenz[110] dargestellt.

Ansatz: 17.80 g (48 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-OH

Ausbeute: 17.1 g (76 % d.Th.)

Fp.: 152°C, Lit. 149-150°C[110]

Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{25}$: -6.3°(c=2, Dioxan), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -6.3°(c=2, Dioxan)[110]

$C_{25}H_{28}N_2O_7$ (468.506) Ber: C 64.09 H 6.02 N 5.98

Gef: C 63.85 H 6.10 N 6.04

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serin-N-hydroxy-succinimidester (Boc-L-Ser(Bzl)-OSu)

Die Verbindung wird hergestellt aus Boc-L-Ser(Bzl)-OH (Fluka), N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid in Dioxan nach Zitat[111].

Ansatz: 2.95 g (10 mMol) Boc-L-Ser(Bzl)-OH

Ausbeute: 3.6 g (91 % d.Th.)

Fp.: 106-109°C, Lit. 112-113°C[111]

Rf_D: 0.78

$[\alpha]_D^{20}$: +5.5° (c=0.5,Dioxan), Lit. $[\alpha]_D^{26}$: +6.5° (c=0.52, Dioxan)[111]

$C_{19}H_{24}N_2O_7$ (392.408) Ber: C 58.15 H 6.16 N 7.13

Gef: C 58.56 H 6.43 N 7.02

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucinmethylester (Boc-Gly-L-Leu-OMe)

14.0 g (80 mMol) Boc-Gly-OH werden in 80 ml absolutem DMF gelöst und auf -10°C gekühlt. Dann gibt man 10.8 g (80 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol, 18.15 g (88 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und eine gekühlte Lösung von 14.53 g (80 mMol) L-Leucinmethylester und 9 ml (80 mMol) N-Methylmorpholin in wenig DMF zu. Die Lösung wird 2 Stunden in der Kälte und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird bei 0°C abgesaugt und das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 40°C abgezogen. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, wie üblich 3 mal sauer (1 N Zitronensäure), basisch (5 % Natriumbicarbonat) und neutral gewaschen und

über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels bleibt ein farbloses Öl zurück, das sich nicht kristallisieren läßt. Es erstarrt nach längerem Stehen im Eisschrank zu einer wachsartigen Masse.

Ausbeute: 22.7 g (94 % d.Th.)

Fp.: 64-66°C

Rf_A: 0.90 Rf_D: 0.85

$[\alpha]_D^{22}$: -20.6° (c=1, MeOH)

$C_{14}H_{26}N_2O_5$ (302.371) Ber: C 55.61 H 8.66 N 9.26

Gef: C 55.38 H 8.49 N 9.31

Glycyl-L-leucinmethylester·Hydrochlorid (H-Gly-L-Leu-OMe·HCl)

5 g (16.5 mMol) Boc-Gly-L-Leu-OMe werden mit 25 ml HCl/Eisessig (1.2 N) übergossen. Da sich die ölige Substanz nicht löst, wird so viel Essigester zugegeben, bis eine klare Lösung vorliegt. Nach ca. einstündigem Rühren bei Raumtemperatur zeigt die DC vollständigen Umsatz. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und die Substanz aus Methanol/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 3.2 g (81.3 % d.Th.)

Fp.: 165°C

Rf_A: 0.52 Rf_D: 0.40

$[\alpha]_D^{24}$: -32.1° (c=1, MeOH)

$C_9H_{19}N_2O_3Cl$ (238.715) Ber: C 45.28 H 8.02 N 11.73 Cl 14.85

Gef: C 45.34 H 8.08 N 11.90 Cl 15.48

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe)

Man löst 4.68 g (10 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-OSu in 30 ml DMF, kühlt auf -15°C und gibt dann 2.38 g (10 mMol) H-Gly-L-Leu-OMe·HCl sowie 1.01 g (10 mMol) N-Methylmorpholin zu. Der Ansatz wird 1 Stunde in der Kälte und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann zieht man das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 40°C ab und nimmt den öligen Rückstand in Essigester auf. Die organische Phase wird dreimal sauer (1 N Zitronensäure), basisch (5 % Natriumbicarbonat) und neutral gewaschen und dann über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels bleibt ein farbloses Öl zurück, dessen Kristallisation nicht gelingt. Bei langsamem Verdunsten des Lösungsmittels erstarrt das Öl zu einer wachsartigen, niedrig schmelzenden Masse. Da die Substanz dünnschichtchromatographisch rein ist, wird ohne weitere Charakterisierung die Aminoschutzgruppe abgespalten.

Ausbeute: 4 g (7o % d.Th.), Verlust durch Verspritzen

Rf_A: 0.52 Rf_D: 0.44

O-Benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe·HCl)

4 g (7 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe werden mit 30 ml HCl/Eisessig (1.2 N) und 3 ml Anisol ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bis durch Dünnschichtchromatographie kein Ausgangsprodukt mehr nachweisbar ist. Dann wird das Lösungsmittel abgezogen, es wird der Rückstand

noch zweimal mit Methanol aufgenommen und zur Trockene einrotiert. Spuren von Anisol werden im Hochvakuum entfernt. Es bleibt ein gelbes Öl, das, gelöst in sehr wenig warmem Methanol, bei vorsichtiger Zugabe von Ether kristallisiert.

Ausbeute: 3.04 g (88 % d.Th.)

Fp.: 106°C

Rf_A: 0.72 Rf_D: 0.60

$[\alpha]_D^{20}$: -22.1° (c=1, MeOH)

$C_{25}H_{34}N_3O_5Cl$ (492.016) Ber: C 61.02 H 6.96 N 8.54 Cl 7.20

(1) Gef: C 58.41 H 6.82 N 8.09

(2) Gef: C 58.31 H 6.85 N 7.97

$C_{25}H_{34}N_3O_5Cl \cdot H_2O$ (511.01)

Ber: C 58.75 H 7.29 N 8.22

Aminosäurenanalyse: (Hydrolyse 6N HCl 110°C, 18 Stunden)

	Tyr	Gly	Leu
Ber:	1.0	1.0	1.0
Gef:	0.78	1	1.04

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe)

0.89 g (3.04 mMol) Boc-L-Ser(Bzl)-OSu wird in 20 ml absolutem DMF gelöst, auf -15°C gekühlt und mit 0.41 g (3.04 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol versetzt. Dann gibt man eine vorgekühlte Lösung von 1.5 g (3.04 mMol) H-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe·HCl und 0.30 g (3.04 mMol) N-Methylmorpholin

in möglichst wenig DMF zu. Man läßt die Kupplung 1 Stunde in der Kälte und dann über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Dann filtriert man in der Kälte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und wäscht mit wenig kaltem DMF. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum bei 40°C abgezogen, der ölige Rückstand in viel Essigester aufgenommen und wie üblich mehrmals sauer(1 N Zitronensäure), basisch (5 % Natriumbicarbonat) und neutral gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Produkt aus Essigester durch Zugabe von Petrolether ausgefällt.

Ausbeute: 1.63 g (63.5 % d.Th.)

Fp.: 140°C

Rf_A: 0.75 Rf_D: 0.67

$[\alpha]_D^{20}$: -15.8° (c=1, MeOH)

$C_{40}H_{52}N_4O_9$ (732.88) Ber: C 65.55 H 7.15 N 7.64

Gef: C 64.99 H 7.41 N 7.48

Aminosäurenanalyse:	Ser	Tyr	Gly	Leu
Ber:	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	0.83	0.91	1.0	1.01

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe·HCl

0.73 g (1 mMol) des geschützten Tetrapeptids Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe werden mit 10 ml 1.2 N HCl/Eisessig übergossen und bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Dann wird das Reagenz am Rotationsverdampfer

abgezogen; der Rückstand wird mehrmals mit Methanol aufgenommen, wieder eingeengt und schließlich über KOH getrocknet. Da die Kristallisation nicht gelingt, wird das Öl nach dünnschichtchromatographischer Reinheitskontrolle direkt umgesetzt.

Ausbeute: 660 g (quantitativ)

Rf_D: 0.74 Rf_A: 0,94

Aminosäurenanalyse: (Hydrolyse 6 N HCl, 110°C, 18 Stunden)

	Ser	Tyr	Gly	Leu
Ber:	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	0.90	0.69	1.0	1.05

2.4. Synthese von Adpoc-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe

N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophan (Adpoc-L-Trp-OH)

Die Verbindung wird hergestellt nach Zitat[73].

Fp.: 127-129°C, Lit. 116°C[73].

Rf_D: 0.58

$[\alpha]_D^{25}$: -6.9° (c=1, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{23}$: -6.8° (c=1, MeOH)[73]

$C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.541) Ber: C 70.56 H 7.81 N 6.58

Gef: C 72.64 H 8.42 N 6.09

Die Analyse konnte trotz mehrfachen Umkristallisierens nicht besser erhalten werden. Eine Erklärung für die Abweichung kann ich nicht geben, zumal die sonstigen analytischen und spektroskopischen Daten sowie das Verhalten der Substanz bei der Umsetzung zum aktivierten Ester der Erwartung entsprach.

N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophan-N-hydroxysuccinimidester (Adpoc-L-Trp-OSu)

4.24 g (10 mMol) Adpoc-L-Trp-OH werden mit 1.15 g (10 mMol) N-Hydroxysuccinimid in 60 ml Dioxan/Acetonitril/Ether (1:1:1) gelöst und auf -15°C gekühlt. Dann gibt man 2.06 g (10 mMol) Dicyclocarbodiimid, gelöst in wenig Dioxan zu und rührt 3 Stunden bei der angegebenen Temperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abgesaugt und das Lösungsmittel bei 30°C im Hochvakuum abgezogen. Das zurückbleibende Öl wird in 70 ml Ether aufgenommen, der erneut ausgefallene Harnstoff abgesaugt und das Produkt mit n-Hexan in der Kälte ausgefällt.

Ausbeute: 3.96 g (76 %)

Fp.: 68°C, Lit. 67-69° [73]

Rf_D: 0.61

$[\alpha]_D^{23}$: -21° (c=1.1, DMF), Lit.$[\alpha]_D^{20}$: -19.6° (c=0.98,DMF)[73]

$C_{29}H_{35}N_3O_6$ (521.61) Ber: C 66.78 H 6.76 N 8.05

Gef: C 66.46 H 7.06 N 8.19

N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucinmethylester (Adpoc-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe)

165 mg (0.25 mMol) H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OMe·HCl werden in 2 ml DMF gelöst und mit 0.25 mg (0.25 mMol, als DMF-Lösung) N-Methylmorpholin versetzt. Dann gibt man 130 mg Adpoc-L-Trp-OSu zu und rührt bei Raumtemperatur. Da nach 12 Stunden praktisch noch kein Umsatz zu beobachten ist, wird nochmals dieselbe Menge Aktivester zuge-

geben. Auch nach 24 Stunden ist laut DC praktisch kein Umsatz zu beobachten.
Das als Ausgangsmaterial verwendete Tetrapeptid kann durch Reinigung über Kieselgel 60 wiedergewonnen werden.

2.5. Synthese von H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucin (Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OH)

200 mg (0.27 mMol) des geschützten Tetrapeptidmethylesters werden in 6 ml Methanol gelöst. Man gibt Wasser bis zur eben einsetzenden Trübung zu und stellt dann den pH mit 1 N NaOH auf 10-11 ein. Dieser Wert wird bis zum Ende der Reaktion eingehalten. Nach kurzer Zeit fällt ein weißer Niederschlag, der sich bis zum Ende der Reaktion nach 90 Minuten wieder löst. Dann wird mit 1 N HCl neutralisiert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, das ausgefallene Kochsalz filtriert und das Produkt durch Zugabe von Ether/Petrolether (1:1) ausgefällt.

Ausbeute: 182 mg (94 % d.Th.)

Fp.: 70-72°C

Rf_D: 0.52

$C_{39}H_{50}N_4O_9$ (718.848) Ber: C 65.15 H 7.01 N 7.79

Gef: C 65.57 H 7.64 N 7.09

N-tert.-Butyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinmethylester (Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2

200 mg (0.27 mMol) Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-OH, 80 mg (0.4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und 37 mg (0.27 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol werden in 1 ml DMF gelöst und auf -20°C gekühlt. Dazu gibt man eine vorgekühlte Lösung von 150 mg (0.27 mMol) H-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2·Acetat und 27 mg (0.27 mMol) N-Methylmorpholin in 1 ml DMF. Die Mischung wird eine Stunde in der Kälte und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene DC-Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum abgezogen. Es bleibt ein gelbes Öl zurück, das, gelöst in wenig Methanol nach Zugabe von Ether/Hexan (3:1) ausfällt. Nach zweimaligem Umfällen erhält man eine weiße, dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz. Chromatographie über Kieselgel 60 (240 - 300 mesh) mit Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser (40:40:40:5) liefert die reine Verbindung.

Ausbeute: 180 mg (55.6 %)

Rf_A: 0.65 Rf_D: 0.51

$C_{59}H_{79}N_{11}O_{14}S$ (1198.39) Ber: C 59.13 H 6.64 N 12.85 S 2.67

Gef: C 59.63 H 6.76 N 12.10 S 3.13

Aminosäurenanalyse:	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	1.06	2.12	1.05	0.85	0.94

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid·Hydrochlorid (H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2·HCl)

60 mg (0.05 mMol) des Boc-geschützten Heptapeptidamids werden mit 2.5 ml HCl/Eisessig (1.2 N) und 0.5 ml Anisol übergossen und bei Raumtemperatur gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt schon nach 15 Minuten vollständige Abspaltung. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum abgezogen, der Rückstand noch zweimal mit Methanol aufgenommen und wieder eingeengt; dann trocknet man das Produkt über KOH, wobei das farblose Öl zu einer festen, weißen Masse erstarrt.

Ausbeute: 55 mg(quantitativ)

Rf_D: 0.55

Die Verbindung wird ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

2.6. Synthese von N-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Adpoc-L-Trp-L-Ser(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2)

55 mg (0.05 mMol) H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-L-Gly-NH_2·HCl werden in 1 ml absolutem DMF gelöst und auf -15°C gekühlt. Dann versetzt man mit 5 mg (0.05 mMol, 5.5 µl) N-Methylmorpholin und 26 mg (0.05 mMol) Adpoc-L-Trp-OSu, rührt eine Stunde in der

Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur. Die DC-Kontrolle nach 5 Stunden zeigt praktisch keinen Umsatz. Darauf wird nochmals dieselbe Menge Adpoc-L-Trp-OSu zugesetzt und insgesamt 48 Stunden weitergerührt. Man fällt durch Zugabe von 10 ml Ether aus: Adpoc-L-Trp-OSu bleibt in Lösung. Der Niederschlag wird in wenig Methanol aufgenommen und auf einer Si 60-Säule chromatographiert (Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5)). Das freie Heptapeptidamid kann in reiner Form zurückerhalten werden. Die laut DC in geringem Umfang neu entstandene Komponente wird als 2. Fraktion isoliert. Laut FD-Massenspektrum handelt es sich nicht um die gewünschte Verbindung (gefundene Masse: 644).

Ausbeute: Freies Heptapeptid (Ausgangssubstanz): 28 mg.

2. Ansatz

11 mg (0.01 mMol) H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 werden in 0.5 ml DMF gelöst und bei $-10^{\circ}C$ mit 4.3 mg (0.01 mMol) Adpoc-L-Trp-OH, 3 mg (0.015 mMol) DCC und 1.1 µl (0.01 mMol, als 10%ige Lösung in DMF) N-Methylmorpholin versetzt. Man rührt in der Kälte und dann bei Raumtemperatur. Auch nach 24 Stunden Rühren und erneuter Zugabe von DCC zeigt das Dünnschichtchromatogramm praktisch keinen Umsatz. Der Ansatz wird verworfen.

2.7. Synthese des aminoterminalen Tripeptids H-L-Pyr-L-His-L-Trp-OH

N-Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure (Z-L-Glu-OH)

Z-L-Glutaminsäure wird nach Zitat [112] aus L-Glu und Chlorameisensäurebenzylester am pH-stat bei pH 9 hergestellt.

Ansatz: 73.5 g (0.5 Mol) L-Glu

Ausbeute: 116.5 g (82.8 % d.Th.)

Fp.: 118°C, Lit. 120-121°C [113]

Rf_A: 0.48 Rf_D: 0.27

$[\alpha]_D^{22}$: -6.1° (c=5, Eisessig), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -7.9° (c=10, HAc) [113]

$C_{13}H_{15}NO_6$ (281.246) Ber: C 55.51 H 5.37 N 4.98

Gef: C 55.38 H 5.40 N 4.92

N-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäureanhydrid (Z-L-Glu$^{-O}_{-O}$)

Die Darstellung erfolgt nach Gibian [84] aus Z-L-Glutaminsäure und Dicyclohexylcarbodiimid in Tetrahydrofuran. In Abwandlung der Vorschrift wird - da nach 12 Stunden die Reaktion noch nicht beendet war - ein 10%iger Überschuß von DCC gegeben und weitere 12 Stunden gerührt.

Ansatz: 84 g (0.3 Mol) Z-L-Glu

Ausbeute: 60.0 g (76 % d.Th.)

Fp.: 89-90°C, Lit. 91-92°C [84]

Rf_A: 0.70 Rf_D: 0.35

$[\alpha]_D^{23}$: -22.6° (c=1.2, Eisessig), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -43.0° (c=2, HAc) [84]

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure-dicyclohexyl-ammoniumsalz (Z-L-Pyr-OH·DCHA)

Die Darstellung erfolgt nach Zitat[84] durch Umsetzung von Z-L-Glutaminsäureanhydrid mit Dicyclohexylamin in Ether.

Ansatz: 28 g (106 mMol) Z-L-Glu-anhydrid

Ausbeute: 37.2 g (78 % d.Th.)

Fp.: 195-196°C, Lit. 199-200°C[84]

Rf_A: 0.65 Rf_D: 0.28

$[\alpha]_D^{20}$: -16.5° (c=3,$CHCl_3$), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -17.4° (c=3.11,$CHCl_3$)[84]

$C_{25}H_{36}N_2O_5$ (444.572) Ber: C 67.54 H 8.16 N 6.26

Gef: C 67.28 H 8.04 N 6.15

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure (Z-L-Pyr-OH)

Z-L-Pyr-OH wird aus dem Dicyclohexylammoniumsalz nach Gibian[84] unter Verwendung von Salzsäure freigesetzt. Die Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ansatz: 22.2 (0.05 Mol)

Ausbeute: 10.8 g (84.5 % d.Th.)

Fp.: 138°C, Lit. 134-135°C[84]

Rf_A: 0.51 Rf_D: 0.46

$[\alpha]_D^{20}$: -28.8° (c=1,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -29.1° (c=101,MeOH)[84]

$C_{13}H_{13}NO_5$ (263.249) Ber: C 59.31 H 4.98 N 5.32

Gef: C 59.18 H 5.12 N 5.28

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure-N-hydroxysuccinimid-ester (Z-L-Pyr-OSu)[85]

5.26 g (20 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure und 2.53 g (22 mMol) N-Hydroxysuccinimid werden in 30 ml 1.2 Dimethoxyethan gelöst und auf -10°C gekühlt. Dann fügt man 4.54 g (22 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zu, rührt 2 Stunden in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und der ölige Rückstand aus Propanol-2 kristallisiert.

Ausbeute: 4.68 g (65 % d.Th.)

Fp.: 128°C, Lit. 130-132°C[85]

Rf_A: 0.72 Rf_D: 0.63

$[\alpha]_D^{25}$: -23° (c=1.8, DMF), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -23° (c=1.8, DMF)[117]

$C_{17}H_{16}N_2O_7$ (360.31) Ber: C 56.67 H 4.47 N 7.77

Gef: C 56.70 H 4.58 N 7.73

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan (Boc-L-Trp-OH)

Die Darstellung erfolgt nach Schnabel[94] aus L-Tryptophan und Boc-Azid.

Ansatz: 51.05 g (0.25 Mol) L-Trp.

Ausbeute: 59.3 g (78 % d.Th.)

Fp.: 138°C, Lit. 137°C[114]

Rf_A: 0.68 Rf_D: 0.34

$[\alpha]_D^{25}$: -17.9° (c=2, Eisessig), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -18.2° (c=2, HAc)[114]

$C_{16}H_{20}N_2O_4$ (304.346) Ber: C 63.14 H 6.62 N 9.20

Gef: C 62.98 H 6.52 N 9.15

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophanbenzylester (Boc-L-Trp-OBzl)

30.4 g (0.1 Mol) Boc-L-Trp-OH werden in einer Mischung von 400 ml Methanol und 40 ml Wasser gelöst und mit 20%iger wäßriger Cäsiumcarbonatlösung neutralisiert (pH 7.0). Dann engt man im Vakuum zur Trockene ein, nimmt noch zweimal mit DMF auf und engt wieder ein. Das zurückbleibende Öl wird in 240 ml DMF aufgenommen und 1 Stunde mit 18.8 g (0.11 Mol) frisch destilliertem Benzylbromid gerührt. Man engt im Hochvakuum zur Trockene ein, versetzt mit 800 ml Wasser und extrahiert mehrmals mit Essigester. Die organische Phase wird mit H_2O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und aus Essigester/Petrolether kristallisiert. Es entstehen schöne, nadelförmige Kristalle.

Ausbeute: 26.8 g (68 % d.Th.)

Fp.: 141°C, Lit. 140-142°C[87]

$[\alpha]_D^{22}$: -2.0° (c=1, EE), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -2.02° (c=1,EE)[87]

$C_{23}H_{26}N_2O_4$ (394.471) Ber: C 70.05 H 6.64 N 7.10

Gef: C 69.98 H 6.55 N 7.05

L-Tryptophanbenzylester·Hydrochlorid (H-L-Trp-OBzl·HCl)

Man versetzt 7.88 g (20 mMol) Boc-L-Trp-OBzl mit 40 ml HCl/Eisessig (1.2 N) und 8 ml (20 %) destilliertem Anisol. Es ergibt sich eine trübe Lösung, die nach wenigen Minuten Rühren zu einer kristallinen Masse erstarrt. Die Kristalle werden abgesaugt, mit Essigester gewaschen und aus heißem Wasser kristallisiert. Es bilden sich schöne Nadeln.

Ausbeute: 5.72 g (86.5 % d.Th.)

Fp.: 218°C. Lit. 222°C [115]

Rf_A: 0.64 Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{25}$: +4.2° (c=2,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +4° (c=2,MeOH) [115]

$C_{18}H_{19}N_2O_2Cl$ (330.815) Ber: C 65.35 H 5.78 N 8.46 Cl 10.71

Gef: C 65.22 H 5.66 N 8.39 Cl 10.74

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidin (Z-L-Pyr-L-His-OH)

Die Verbindung wird nach Zitat[85] aus Z-L-Pyr-OSu und H-L-His-ONa in Dioxan/Wasser hergestellt.

Ansatz: 7.24 g (20 mMol) Z-L-Pyr-OSu

Ausbeute: 5.28 g (66 % d.Th.)

Fp.: 158°C, Lit. 148°C[85]

Rf_A: 0.44 Rf_D: 0.15

$[\alpha]_D^{20}$: -0.9° (c=1, DMF), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -0.8°(c=1, DMF) [56]

$C_{19}H_{20}N_4O_6 \cdot 1{,}5\ H_2O$ (427.413) Ber: C 53.39 H 5.42 N 13.11

Gef: C 53.78 H 5.35 N 13.33

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophanbenzylester (Z-L-Pyr-L-His-L-Trp-OBzl)

0.84 g (2 mMol) Z-L-Pyr-L-His-OH und 0.26 g (2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol werden in 10 ml DMF gelöst, auf -15°C gekühlt und dann mit 0.45 g (2.2 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach kurzer Zeit gibt man eine gekühlte Lösung von 0.66 g (2 mMol) L-Trp-OBzl·HCl und 0.20 g (2 mMol) N-Methylmorpholin in wenig DMF zu, rührt eine Stunde in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur.

Der ausgefallene DC-Harnstoff wird bei 0°C abgesaugt und mit wenig DMF gewaschen. Das Filtrat wird im Hochvakuum bei 40°C eingeengt und der ölige Rückstand in Essigester gelöst. Man wäscht je dreimal sauer, basisch und neutral und trocknet die organische Phase über Na_2SO_4. Das Produkt wird aus Methanol/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 1.06 g (78.5 % d.Th.)

Fp.: 105°C (Sintern ab 95°C)

Rf_A: 0.81 Rf_D: 0.50

$[\alpha]_D^{25}$: -30.2° (c=1, MeOH)

$C_{37}H_{36}N_6O_7$ (676.73) Ber: C 65.67 H 5.36 N 12.42

Gef: C 65.82 H 5.43 N 12.04

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophan·Acetat (H-L-Pyr-L-His-L-Trp-OH·HAc)

Man löst 1 g (1.48 mMol) Z-L-Pyr-L-His-L-Trp-OBzl in 30 ml Methanol, versetzt mit 5 ml Wasser und stellt mit Essigsäure den pH zwischen 4.5 und 5 ein. Dann gibt man 100 mg Pd/Aktivkohle (10 %) zu, sättigt mit Stickstoff und leitet unter pH-Kontrolle so lange einen schwachen Wasserstoffstrom ein, bis laut DC kein Ausgangsprodukt mehr nachweisbar ist (ca. 2 Stunden). Der Katalysator wird über Celite abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und vernichtet. Das Filtrat wird im Hochvakuum zur Trockene eingeengt und das zurückbleibende Öl in Wasser aufgenommen. Nach dem Lyophilisieren bleibt ein leichter Schaum, der bei Kontakt mit Luft zerfließt.

Ausbeute: 0.75 g (quantitativ)

Rf_A: 0.38 Rf_D: 0.09

$[\alpha]_D^{25}$: -25.0° (c=1.1, H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -21.8° (c=1.06, H_2O) [116]

$C_{24}H_{28}N_6O_7$ (512.523) Ber: C 56.24 H 5.50 N 16.39

Gef: C 55.88 H 5.62 N 16.10

Aminosäurenanalyse (Hydrolyse mit 6 N HCl, 18 Stunden bei 110°C)

	Glu	His	Trp
Ber:	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	1.02	-

2.8. Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N_G-(p-methoxybenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (H-L-Pyr-L-His-L-Trp-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2

11 mg (0.01 mMol) H-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-Gly-L-Leu-L-Arg-(Mbs)-L-Pro-Gly-NH_2 und 5.1 mg (0.01 mMol) H-L-Pyr-L-His-L-Trp-OH·HAc werden in ca. 1 ml DMF gelöst, gekühlt und mit 4 mg DCC und 1 mg N-Methylmorpholin (als Lösung) versetzt. Man rührt 2 Stunden in der Kälte und 24 Stunden bei Raumtemperatur. Dann engt man etwas ein, fällt durch Zugabe von Essigester aus und reinigt den öligen Rückstand über Kieselgel 60 (Merck Fertigsäule Größe A, 2 x, Chloroform/Methanol 7:3). Bei langsamer Elution gelingt es, eine Fraktion zu erhalten, die dem Produkt

auf dem Dünnschichtchromatogramm entspricht.

Diese Fraktion wird mit 6 N Salzsäure hydrolysiert (18 Stunden, N_2-Sättigung, 110°C)

Aminosäurenanalyse:

Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
0.97	0.98	-	0.9	0.79	2	1.0	1.01	0.8

2.9. Peptidsynthese unter Verwendung der N^{τ}-Alkylhistidine

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-N^{τ}-methyl-L-histidin (Z-L-Pyr-L-His(N^{τ}-Me)-OH)

1.48 g (4.11 mMol) Z-L-Pyr-OSu werden in 5 ml Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 0.69 g (4.11 mMol) H-L-His(N^{τ}-Me)-OH und 0.43 g (4.1 mMol) wasserfreiem Natriumcarbonat in 5 ml Wasser versetzt. Man rührt 4 Stunden bei Raumtemperatur und neutralisiert dann mit 0.1 N Salzsäure. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum abgezogen, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und das nicht gelöst Kochsalz abfiltriert. Da die Kristallisation aus 30 % Methanol (wie bei der nicht-alkylierten Verbindung) nicht gelingt, wird das Produkt durch zweimaliges Umfällen aus Methanol/Ether gewonnen.

Ausbeute: 1.05 g (62 %)

Fp.: 144°C

Rf_D: 0.54

$C_{20}H_{22}N_4O_6$ (414.4) Ber: C 57.96 H 5.35 N 13.52

Gef: C 57.91 H 5.53 N 12.76

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-N^{τ}-ethyl-L-histidin (Z-L-Pyr-L-His-(N^{τ}-Et)-OH)

0.72 g (2 mMol) Z-L-Pyr-OSu werden in 4 ml Dioxan gelöst. Man vereinigt mit einer Lösung von 0.36 g (2 mMol) H-L-His(N^{τ}-Et)-OH und 0.21 g (2 mMol) wasserfreiem Natriumcarbonat in 3 ml Wasser und rührt 6 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion neutralisiert man mit 0.1 N Salzsäure und engt den Ansatz im Hochvakuum zur Trockene ein. Das zurückbleibende Öl wird in wenig Methanol aufgenommen, das nicht gelöste Kochsalz abfiltriert und das Produkt durch Umfällen aus Methanol/Ether gewonnen.

Ausbeute: 490 mg (58 %)

Fp.: 156-158°C

Rf_A: 0.56 Rf_D: 0.20

$C_{21}H_{24}N_4O_6$ (428.445) Ber: C 58.87 H 5.64 N 13.08

Gef: C 58.92 H 5.11 N 12.83

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein neues Verfahren beschrieben, am Imidazolrest alkylierte Histidinderivate darzustellen. Durch Umsetzung von L-Histidinmethylester mit Phosgen tritt unter CO-Einschiebung eine Cyclisierung zwischen N^{α} und N^{π} unter Ausbildung eines stabilen Tetrahydropyrimidinderivates ein. Ein Nebenprodukt der Reaktion wird isoliert, seine Entstehung und Struktur wird aufgeklärt. Der Mechanismus der Umsetzung wird diskutiert.

Da in dem dargestellten Tetrahydropyrimidinderivat der π-Stickstoff des Imidazolrestes geschützt ist, kann der τ-Stickstoff unter Verwendung üblicher Verfahren selektiv alkyliert werden. Die anschliessende Freisetzung mit Salzsäure liefert unter Abspaltung von CO das entsprechende L-N^{τ}-Alkylhistidin als Dihydrochlorid.

Die Umsetzung verläuft mit hohen Ausbeuten und unter Erhalt der Konfiguration der eingesetzten Verbindungen. Sie kann mit gleichem Erfolg auf D-Histidin übertragen werden.

Damit steht ein neues Verfahren zur Verfügung, in τ-Position alkylierte Histidine mit einfachen Mitteln in stereospezifischer Reaktion herzustellen.

Die dargestellten Alkylhistidine und die Zwischenprodukte werden durch ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektros-

kopie sowie durch Massenspektren charakterisiert, ihre Verwendbarkeit bei der Synthese von Peptiden wird beschrieben.

Im zweiten Teil der Arbeit wird ein Syntheseweg zur Darstellung des Gonadoliberins nach Verfahren der klassischen Peptidsynthese beschrieben. Durch stufenweisen Aufbau werden Fragmente synthetisiert und durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie und FD-Massenspektren charakterisiert. Die Kondensation der Fragmente liefert das geschützte Dekapeptid. Der Einsatz der Benzylether-Funktion zum Schutz von Serin und Tyrosin erweist sich als nicht vorteilhaft: Zwar ist die Stabilität im Verlauf der Synthese gut, es werden keine Nebenreaktionen beobachtet und die hydrogenolytische Abspaltung an einem Modellpeptid verläuft glatt; allerdings liefern alle Versuche, α-aminogeschütztes Tryptophan oder Peptide mit C-terminalem Tryptophan mit Peptiden zu kuppeln, die aminoterminal eine Benzylseryl-Gruppe tragen, mäßige bis schlechte Ausbeuten.

Offenbar behindern die voluminösen Schutzgruppen und Seitenketten (Benzylether, Indol, α-Aminoschutzgruppe des Tryptophans) diese Umsetzung.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) Eur.J.Biochem.27, 201 (1972)
2. V.du Vigneaud and O.K.Behrens, Ergeb.Physiol.,biol. Chem. u.exp.Pharmakol.41, 917 (1939)
3. W.Keil, Z.Physiol.Chem.187, 1 (1930)
4. J.M.Searle and R.G.Westall, Biochem.J.48, 1 (1951)
5. H.H.Tallan, W.H.Stein, and S.Moore, J.Biol.Chem.2o6, 825 (1954)
6. P.O.Dennis and P.A.Lorkin, J.Chem.Soc. 4968 (1965)
7. J.A.Zapp and D.W.Wilson, J.Biol.Chem. 126, 9 (1938)
8. A.Carisano, J.Chromatog.13, 83 (1964)
9. W.R.D.Rangeley and R.A.Lawrie, J.Fd.Technol.12, 9 (1977)
10. W.R.D.Rangeley and R.A.Lawrie, J.Fd.Technol.11,143 (1976)
11. L.C.Ward and P.J.Buttery, Life Sci. 23, 1103 (1978)
12. L.N.Haverberg, P.T.Omstedt, H.W.Munto,and V.R.Young, Biochim.Biophys.Acta 405, 67 (1975)
13. V.R.Young, B.S.Baliga, S.D.Alexis, and H.N.Munro, Biochim.Biophys.Acta 199, 297 (1970)
14. V.R.Young, S.D.Alexis, B.S.Baliga, and H.N.Munro, J. Biol.Chem.247, 3592 (1972)
15. L.C.Ward and W.G.E.Cooksley, Clin.Chim.Acta 91, 363 (1979)
16. L.C.Ward, M.Miller, and S.Hawgood, J.Chromatog.223, 417 (1981)
17. D.H.Spackman, W.H.Stein, and S.Moore, Anal.Chem.30, 1190 (1958)
18. Z.Friedman, H.W.Smith, and W.S.Hancock, J.Chromatog. 182, 414 (1980)
19. I.R.McManus, J.Biol.Chem.235, 1398 (1959)
20. F.Schneider, Angew.Chem.90, 616 (1978)

21. R.J.Sundberg und R.B.Martin, Chem.Rev.74, 471 (1974)

22. R.Deslauriers, W.H.McGregor, D.Sarantakis, and I.C.P. Smith, Biochemistry 13, 3443 (1974)

23. E.Buddecke, Grundriß der Biochemie, W.De Gruyter, New York, 1977

24. R.B.Woodward, Pure and applied Chemistry 17, 519 (1968)

25. O.D.van Batenburg, I.Voskyul-Holtkamp, C.Schattenkerk, K.Hoes, K.T.Kerling, and E.Haringa, Biochem.J. 163, 385 (1977)

26. A.C.M.Paiva and T.B.Paiva, Biochim.Biophys.Acta 48, 412 (1961)

27. K.Hsieh, E.C.Jorgensen, and T.C.Lee, J.Med.Chem.22, 1199 (1979)

28. K.H.Hsieh, I.C.Kiraly-Olah, E.C.Jorgensen, and T.C.Lee, J.Med.Chem.22, 1044 (1979)

29. J.Rivier, M.Brown, C.Rivier, N.Ling, and W.Vale, Pept., Proc.Eur.Pept.Symp., 14th, 1976, 427 (1977)

30. R.Deslauriers, A.C.Paiva, K.Schaumburg, and I.C.P. Smith, Biochemistry 14, 878 (1975)

31. I.C.P.Smith and R.Deslauriers, Rec.Prog.Horm.Res.33, 309 (1977)

32. J.Rivier, W.Vale, M.Monahan, N.Ling, and R.Burgus, J.Med.Chem.15, 479 (1972)

33. W.Vale, J.Rivier, and R.Burgus, Endocrinology 89, 1485 (1971)

34. L.Juliano, P.Boschcov, in E.Gross, J.Meienhofer(Hrsg.) Pept., Struct.Biol.Funct., Proc.Am.Pept.Symp.6th,1979, 555, Pierce Chem.Co., Rockford, Ill.

35. A.Schally, D.H.Coy, C.A.Meyers, and A.J.Kastin in Hormonal Proteins and Peptides, Vol.VII, (Hrsg. C.H.Li) Academic Press, New York 1979

36. J.Humphries, Y.Wan, T.Wasiak, and K.Folkers, J.Med. Chem.22, 774 (1979)

37. A.Stetler-Stevenson, D.C.Yang, A.Lipkowski,L.McCartney, D.Peterson, and G.Flouret, J.Med.Chem.24, 688 (1981)

38. W.Vale, G.Grant, J.Rivier, M.Monahan, M.Amoss, R.Backwell, R.Burgus, and R.Guillemin, Science 176, 933 (1972)

39. D.H.Coy, E.J.Coy, J.A.Vilchez-Martinez, A.de la Cruz, A.Arimura, and A.V.Schally, in "Hypothalamus and Endocrine Functions", Plenum, New York 1976

40. J.Raap and K.E.T.Kerling, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 100, 62 (1981)

41. M.Fujino, S.Kobayashi, M.Obayashi, F. Fukuda, S.Shinagawa, I.Yamazahi, R.Nakayama, W.F.White, and R.H.Rippel, Biochem.Biophys.Res.Comm. 49, 698 (1972)

42. R.M.G.Nair, J.Sagel, J.A.Colwell, R.S.Mathur, J.M. Powers, J.L.Luborsky-Moore, and W.C.Worthington (Jr) in D.Gupta and W.Voelter (Eds.) Hypothalamic Hormones - Chemistry, Physiology and Clinical Applications, Verlag Chemie, Weinheim (1978)

43. H.H.Tallan, W.H.Stein and S.Moore, J.Biol.Chem.206, 825 (1954)

44. H.Rinderknecht, T.Rebane and V.Ma, J.Org.Chem.293, 1968 (1964)

45. P.K.Martin, H.R.Matthews, H.Rapoport and G.Thyagarajan, J.Org.Chem.33, 3758 (1968)

46. W.E.Keller, Compendium of Phase-Transfer Reactions and Related Synthetic Methods, Fluka AG., Buchs, 1979

47. E. Dehmlow, Angew.Chem.89, 521 (1977)

48. G.W.Gokel and W.P.Weber, J.Chem.Educ.55 (6) , 350 (1978)

49. A.Brandström et al., Acta Chem.Scand.23, 2202 (1969)

50. K.Berg-Nielsen and E.Bernatek, Acta Chem.Scand.26, 4130 (1972)

51. A.Barco, S.Benetti, and G.P.Pollini, Synthesis 1976,124

52. B.Mlotkowska and A.Zwierzak, Tetrahedron Lett. 47, 4731 (1978)

53. A.Noordam, L.Maat, and H.C.Beyerman, Rec.Trav.Chim. Pays-Bas 97, 293 (1978)

54. E.Breitmaier and W.Voelter, ^{13}C NMR Spectroscopy, Verlag Chemie, Weinheim 1978

55. E.Pretsch, T.Clerc, J.Seibl, W.Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer-Verlag, Berlin 1981

56. S.Fuchs, Dissertation, Tübingen 1975

57. P.F.Knowles, D.Marsh, H.W.E.Rattle, Magnetic Resonance of Biomolecules, John Wiley & Sons, London 1976

58. H.R.Matthews and H.Rapoport, J.Am.Chem.Soc. 95, 2297 (1973)

59. W.F.Reynolds, I.R.Peat, M.H.Freedman, and J.R.Lyerla (Jr) J.Am.Chem.Soc.95, 328 (1973)

60. K.Lübke, E.Schröder, G.Kloss, Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I, Thieme, Stuttgart 1975

61. A.V.Schally, R.M.G.Nair, T.W.Redding, and A.Arimura, J.Biol.Chem.246, 6647 (1971)

62. A.V.Schally, Y.Baba, A.Arimura, R.M.G.Nair, T.W. Redding, H.Matsuo, and L.Debeljuk, Biochem.Biophys. Res.Comm. 43, 393 (1971)

63. H.Matsuo, Y.Baba, R.M.G.Nair, A.Arimura, and A.V.Schally, Biochem.Biophys.Res.Comm. 43, 1334 (1971)

64. R.M.G.Nair and A.V.Schally, Int.J.Peptide Protein Res. 5, 421 (1972)

65. R.Burgus, M.Butcher, and A.Amoss, Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 69, 278 (1972)

66. T.Wasiak, J.Humphries, K.Folkers and C.Y.Bowers, Biochem. Biophys.Res.Comm. 86, 843 (1979)

67. M.Bodanszky, M.L.Fink, Y.S.Klausner, S.Natarajan, K.Tatemoto, A.E.Yiotakis, and A.Bodanszky, J.Org.Chem.42, 149 (1977)

68. E.Wünsch, E.Jäger, L.Kisfaludy, and M.Löw, Angew. Chem. 89, 330 (1977)

69. M.Bodanszky and J.Martinez, Synthesis, 1980, 333

70. R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 41, 1867 (1958)

71. O.Nishimura and M.Fujino Chem.Pharm.Bull.24, 1568 (1976)

72. D.Yamashiro and C.H.Li, Int.J.Pept.Prot.Res.4, 181 (1972)

73. H.Kalbacher, Dissertation, Tübingen 1980

74. S.Terada, A.Kawabata, N.Mitsuyasu, H.Aoyagi, and N.Izumiya, Bull.Chem.Soc.Jap.51, 3409 (1978)

75. J.H.Jones and W.I.Ramage, J.Chem.Soc.,Chem.Comm. 472 (1978)

76. J.H.Jones, W.I.Ramage, and M.J.Witty, Int.J.Pept.Prot. Res.15, 301 (1980)

77. W.König and R.Geiger, Chem.Ber.103, 788 (1970)

78. N.L.Benoiton, K.Kuroda, and F.M.F.Chen, Int.J.Peptide Res. 13, 403 (1979)

79. M.Goodman, P.Keogh, and H.Anderson, Bioorg.Chem.6, 239 (1977)

80. H.Horn, Dissertation, Tübingen 1981

81. E.Wünsch, persönliche Mitteilung

82. R.J.Pugmire, M.J.Robins, D.M.Grant, and R.K.Robins, J.Am.Chem.Soc.93, 1887 (1971)

83. W.Fuchs, H.Kalbacher, and W.Voelter, Org.Magn.Res.17, 157 (1981)

84. H.Gibian and E.Klieger, Ann.Chem. 640, 145 (1961)

85. P.Kurath and A.M.Thomas, Helv.Chim.Acta 56, 1656 (1972)

86. M.Wilchek and A.Patchornik, J.Org.Chem.28, 1874 (1963)

87. S.Wang,B.F.Gisin, D.P.Winter, R.Makofske, I.D.Kulesha, C.Tzougraki,and J.Meienhofer, J.Org.Chem.42, 1286 (1977)

88. H.Layer, Diplomarbeit, Tübingen 1982

89. J.Honzl und J.Rudinger, Collect.Czech.Chem. Commun. 26, 2333 (1961)

90. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa.E.Merck AG., Darmstadt, 1970

91. L.Carpino, C.A.Giza, and B.A.Carpino, J.Am.Chem.Soc. 81, 955 (1957)

92. J.B.Greenstein and M.Winitz:"Chemistry of the Amino Acids" , J.Wiley & Sons Inc., New York, 1961

93. Organikum, 11. Aufl.,VEB Verlag Berlin 1972

94. E.Schnabel, Justus Liebigs Ann.Chem.702, 188 (1967)

95. N.C.Davis, J.Biol.Chem.223, 935 (1956)

96. P.K.Martin, H.R.Matthews, H.Rapoport, and G.Thyagarajan, J.Org.Chem.33, 3758 (1968)

97. H.Künzi, D.Gillesen, A.Trzeciak, R.O.Studer, B.Kerdelhué, M.Jutisz, and W.Lotz, Helv.Chim.Acta 57, 2131 (1974)

98. E.Wünsch, in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl- Müller), Band XV/1, Thieme, Stuttgart 1974

99. O.Nishimura and M.Fujino, Chem.Pharm.Bull.24 (7), 1568 (1976)

100. G.W.Anderson, J.E.Zimmerman,and F.M.Callahan, J.Am. Chem.Soc.86, 1839 (1964)

101. R.A.Boissonnas and S.Guttmann, Helv.Chim.Acta 39, 1422 (1956)

102. T.Curtius and F.Goebel, J.Prakt.Chem.37, 150 (1888)

103. M.Brenner and W.Huber, Helv.Chim.Acta 36, 1109 (1953)

104. E.Sandrin und R.A.Boissonas, Helv.Chim.Acta 46, 1637 (1963)

105. J.S.Morley, J.Chem.Soc (C), 2410 (1967)

106. R.Schwyzer, P.Sieber und H.Kappeler, Helv.Chim.Acta 42, 2622 (1959)

107. C.K.Chang, J.Am.Chem.Soc.99, 2819 (1977)

108. J.P.Collman, J.I.Brauman, K.M.Doxsee, T.R.Halbert, and K.S.Suslick, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 564 (1978)

109. W.S.Brinigar and C.K.Chang, J.Am.Chem.Soc.96, 5597 (1974)

110. C.Sorg, E.Rüde, and O.Westphal, Justus Liebigs Ann. Chem. 734, 180 (1970)

111. D.A.Laufer and E.R.Blout, J.Am.Chem.Soc. 89, 1246 (1967)

112. M.Bergmann and L.Zervas, Chem.Ber. 65, 1192 (1932)

113. S.Goldschmidt and C.Jutz, Chem.Ber. 86, 1116 (1953)

114. H.Wollmann, Diplomarbeit, Tübingen 1978

115. M.Wilchek and A.Patchornik, J.Org.Chem.28, 1874 (1963)

116. M.Fujino, S.Kobayashi, M.Obayashi, T.Fukuda, S.Shinagawa, and O.Nishimura, Chem.Pharm.Bull. 22, 1857 (1974)

117. G.W.Anderson and A.C.McGregor, J.Am.Chem.Soc.79, 6180 (1957)

L E B E N S L A U F

Name:	Hartmut A. Wollmann
Geburtstag und -ort:	8.9.1951 in Roigheim, Kreis Heilbronn
Eltern:	Karl Wollmann und Anneliese Wollmann geb. Ziegler
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	seit 1973 verheiratet mit Ulrike Wollmann-Zöller 11.5.1980: Geburt unseres Sohnes Janusz
Schulbesuch:	
1958-1962	Grundschule in Roigheim
1962-1970	Gymnasium in Möckmühl
6.6.1970	Ablegung der Reifeprüfung in Möckmühl
Studium:	
WS 1970/71	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
25.10.1973	Abschluß des Vordiploms
Oktober 1976	Mündliche Diplomprüfung
Febr.1977- Dez.1977	Diplomarbeit: Synthese des C-terminalen Hexapeptid-Amids von Cholecystokinin/ Pancreozymin
SS 1976	Immatrikulation für Humanmedizin
April 1978 - März 1980	Praktischer Teil der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof.Dr.W.Voelter (Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes)
Sept.1978	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
April 1980 - April 1982	Wiss.Angestellter am Institut für Organische Chemie: Nachweis von Insektiziden/ Wechselwirkung mit Hormonen
Sept.1981	Ablegung des 1.Abschnittes der ärztlichen Prüfung

Meine akademischen Lehrer im Fach Chemie waren:

E.Bayer, W.Braun, E.Breitmaier, G.Gauglitz, F.Gönnenwein, G.Häfelinger, H.Hagenmaier, M.Hanack, V. Hoffmann, G.Jung, W.Kraus, H.Krüger, S.Kemmler-Sack, W.König, D.Krug, U.Kunze, E.Lindner, I.P.Lorenz, M.Mauser, H.Meier, E.Müller, H.Oberhammer, D.Oelkrug, H.Pauschmann, G.Pausewang, A.Rieker, W.Rüdorff, W.Rundel,V.Schurig, W.Schweizer, F.F.Seelig, H.Stegmann, J.Strähle, E.Stumpp, H.Suhr, W.Voelter, W.Zeil und K.P.Zeller.

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 0 71 21/4 53 77